

# Untersuchungen zur Biotransformation neuer substituierter Piperidylbenzilate

## Dissertation

Zur Erlangung des akademischen Grades

**doctor rerum naturalium**

(Dr. rer. nat.)

im Fach Pharmazie

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Berit Eyrich

geboren am 21. Juli 1973 in Berlin

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin:

Prof. Dr. Jürgen Mlynek

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I:

Prof. Dr. Bernhard Ronacher

1. Gutachter: Prof. Dr. B. Göber
2. Gutachter: Prof. Dr. H.-H. Borchert
3. Gutachter: Prof. Dr. R. Stößer

Tag der mündlichen Prüfung: 30. April 2002

Die hier vorliegende Dissertation entstand am Institut für Pharmazie der Humboldt-Universität zu Berlin unter Leitung von Prof. Dr. B. Göber, dem ich für die Überlassung dieses interessanten Themas und für die Betreuung mit den hilfreichen Diskussionen und Anregungen danken möchte.

Ganz besonders möchte ich mich auch bei den Mitarbeitern des Institutes für Chemie der Humboldt-Universität zu Berlin bedanken. Insbesondere möchte ich dabei Herrn Dr. M. Löwis of Menar, Frau A. Woyda und Frau A. Thiesies erwähnen, die die EI-Masse- und die Kernresonanzspektren aufnahmen.

Mein weiterer Dank gilt den Mitarbeitern des Institutes für Pharmakologie und Toxikologie, die bei der Durchführung der Tierversuche behilflich waren. Dabei möchte ich mich besonders bei Prof. Dr. R. Morgenstern und Dr. T. Reum bedanken, die durch Bereitstellung der Tiere und der Räumlichkeiten diese Arbeit erst ermöglichten.

Allen Mitarbeitern des Institutes für Pharmazie, insbesondere der Arbeitsgruppe Pharmazeutische Chemie, möchte ich für die Unterstützung beim Zustandekommen dieser Arbeit danken.

Mein besonderer Dank gilt dabei Herrn Dr. Peter Witte für die Hilfe bei der Durchführung der GC-MS-Messungen.

Herrn Dr. T. Vorwerk und Frau Dr. K. Smolinka danke ich für die Synthese der Ausgangs- und einiger Vergleichssubstanzen.

## Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis .....	3
Abbildungsverzeichnis.....	7
Schemataverzeichnis .....	8
Tabellenverzeichnis .....	9
Verzeichnis der verwendeten Substanzbezeichnungen (Teil I), ausklappbar.....	10
(Teil II, s. Seite 149)	
Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen .....	11
<b>1 Einleitung und Problemstellung .....</b>	<b>13</b>
<b>2 Biotransformation und biomimetische Umsetzung von Benzilaten - Literaturübersicht.....</b>	<b>15</b>
<b>3 Untersuchungen und Ergebnisse .....</b>	<b>24</b>
3.1 Applikationsdosis, Eliminationsdauer und Dosierungsschema.....	24
3.2 Aufarbeitung des biologischen Materials .....	26
3.2.1 Vergleich verschiedener Aufarbeitungsmethoden .....	26
3.2.2 Reinigung der Proben .....	27
3.2.3 Isolierung der Metabolite .....	29
3.3 Analytische Charakterisierung der Metabolite .....	30
3.3.1 DC-Untersuchungen .....	30
3.3.2 HPLC- und UV-Untersuchungen .....	32
3.3.3 MS-Untersuchungen .....	33
3.4 Metabolisierung von (R,S)-N-Methyl-4-piperidyl 3,4-dimethoxybenzilat ( <b>1</b> ) ...	37
3.4.1 Analytische Charakterisierung der Metabolite .....	37
3.4.1.1 DC-Untersuchungen .....	37
3.4.1.2 HPLC- und UV-Untersuchungen .....	39
3.4.1.3 MS-Untersuchungen .....	41
3.4.2 Identifizierung der Metabolite .....	43
3.4.3 Phase-II-Metabolite .....	50
3.4.4 Kotmetabolite .....	50

3.5	Metabolisierung von (R,S)-N-Methyl-3-piperidyl 3,4-dimethoxybenzilat ( <b>2</b> )	52
3.5.1	Analytische Charakterisierung der Metabolite	52
3.5.1.1	DC-Untersuchungen	52
3.5.1.2	HPLC- und UV-Untersuchungen	55
3.5.1.3	MS-Untersuchungen	56
3.5.2	Identifizierung der Metabolite	59
3.5.3	Phase-II-Metabolite	61
3.5.4	Kotmetabolite	62
3.6	Metabolisierung von N-Methyl-4-piperidyl 3,3'-dimethoxybenzilat ( <b>3</b> )	63
3.6.1	Analytische Charakterisierung der Metabolite	63
3.6.1.1	DC-Untersuchungen	63
3.6.1.2	HPLC- und UV-Untersuchungen	66
3.6.1.3	MS-Untersuchungen	67
3.6.2	Identifizierung der Metabolite	70
3.6.3	Phase-II-Metabolite	72
3.6.4	Kotmetabolite	72
3.7	Metabolisierung von (R,S)-N-Methyl-3-piperidyl 3,3'-dimethoxybenzilat ( <b>4</b> )	73
3.7.1	Analytische Charakterisierung der Metabolite	73
3.7.1.1	DC-Untersuchungen	73
3.7.1.2	HPLC- und UV-Untersuchungen	76
3.7.1.3	MS-Untersuchungen	77
3.7.2	Identifizierung der Metabolite	80
3.7.3	Phase-II-Metabolite	82
3.7.4	Kotmetabolite	83
3.8	Einfluss der Dosierung	83
3.9	Synthese und analytische Charakterisierung der Lactame	84
3.9.1	Synthese der Lactame	84
3.9.2	Analytik der Lactame - im Vergleich zu den N-Formylderivaten	85
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>92</b>
4.1	Biotransformation unter Berücksichtigung der Reaktionsmechanismen	92
4.2	Vergleich der Biotransformation der untersuchten Benzilsäureester	101

4.3	Vergleich der Biotransformation mit verwandten Benzilaten.....	104
4.4	Vergleich der Biotransformation von Benzilaten mit ihrer biomimetischen Um- setzung.....	105
4.5	Metabolisierung und Wirksamkeit .....	108
<b>5</b>	<b>Experimenteller Teil .....</b>	<b>109</b>
5.1	Geräte .....	109
5.2	Chemikalien und Vergleichssubstanzen.....	110
5.2.1	Chemikalien und kommerziell erworbene Vergleichssubstanzen.....	110
5.2.2	Synthetisierte Vergleichssubstanzen .....	111
5.2.2.1	(R,S)-N-Methyl-4-piperidyl 3,4-dimethoxybenzilat ( <b>1</b> ) und verwandte Verbindungen .....	111
5.2.2.2	(R,S)-N-Methyl-3-piperidyl 3,4-dimethoxybenzilat ( <b>2</b> ) und verwandte Verbindungen .....	117
5.2.2.3	N-Methyl-4-piperidyl 3,3'-dimethoxybenzilat ( <b>3</b> ) und verwandte Ver- bindungen .....	122
5.2.2.4	(R,S)-N-Methyl-3-piperidyl 3,3'-dimethoxybenzilat ( <b>4</b> ) und verwandte Verbindungen .....	126
5.3	Biotransformationsuntersuchungen.....	129
5.3.1	Tiermaterial .....	129
5.3.2	Applikation und Gewinnung der biologischen Proben .....	129
5.3.3	Probenvorbereitung .....	129
5.3.3.1	Ermittlung der besten Reinigungsmethode .....	129
5.3.3.1.1	Reinigung durch Flüssig-Flüssig-Extraktion.....	129
5.3.3.1.2	Reinigung durch Flüssig-Flüssig-Extraktion mittels Extrelut® .....	130
5.3.3.1.3	Reinigung durch Flüssig-Fest-Extraktion mittels Amberlite® XAD-2 .....	130
5.3.3.2	Aufarbeitung.....	131
5.3.4	Trennung und Isolierung der Metabolite.....	132
5.4	Analytische Methoden.....	133
5.4.1	Dünnschichtchromatographie.....	133
5.4.1.1	Analytische Dünnschichtchromatographie.....	133

5.4.1.2 Präparative Schichtchromatographie.....	133
5.4.2 HPLC.....	134
5.4.2.1 Analytische HPLC.....	134
5.4.2.2 Präparative HPLC.....	134
5.4.3 UV-spektroskopische Untersuchungen .....	135
5.4.4 IR-spektroskopische Untersuchungen .....	135
5.4.5 Massenspektrometrische Untersuchungen .....	135
5.4.6 GC-MS-Untersuchungen.....	135
5.4.7 Kernresonanzspektroskopische Untersuchungen .....	136
<b>6 Zusammenfassung.....</b>	<b>137</b>
Literatur.....	140
Verzeichnis der verwendeten Substanzbezeichnungen (Teil II), ausklappbar.....	149

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Piribenzil-methylsulfat (Metabolisierung in der Ratte und im Menschen) .....	15
Abb. 2: Benactyzin (Metabolisierung in der Ratte).....	15
Abb. 3: Benapryzin (Metabolisierung in der Ratte und im Menschen) .....	16
Abb. 4: Propiverin (Metabolisierung in der Ratte und im Menschen).....	16
Abb. 5: N-Methyl-4-piperidyl benzilat (Metabolisierung in der Ratte).....	18
Abb. 6: N-Ethyl-3-piperidyl benzilat, (R,S)-N-Methyl-4-piperidyl 4-methoxybenzilat .... (Metabolisierung in der Ratte).....	18
Abb. 7: Denaverin (Metabolisierung in der Ratte und im Menschen) .....	19
Abb. 8: Epicainid (Metabolisierung in der Ratte und im Menschen).....	20
Abb. 9: Trosipiumchlorid (Metabolisierung im Menschen).....	20
Abb. 10: HPLC-Chromatogramme verschiedener Metabolitenextrakte von <b>1</b> .....	40
Abb. 11: <sup>1</sup> H-NMR-Spektrum von <b>6</b> .....	46
Abb. 12: <sup>13</sup> C-NMR-Spektrum von <b>6</b> .....	47
Abb. 13: Isomere Formen des N-Oxids.....	48
Abb. 14: Mögliche Strukturen von <b>13</b> .....	49
Abb. 15: HPLC-Chromatogramme verschiedener Metabolitenextrakte von <b>2</b> .....	55
Abb. 16: HPLC-Chromatogramme verschiedener Metabolitenextrakte von <b>3</b> .....	66
Abb. 17: HPLC-Chromatogramme verschiedener Metabolitenextrakte von <b>4</b> .....	76
Abb. 18: Artefakte bei der Metabolisierung von <b>4</b> .....	82
Abb. 19: Fragmentation <b>m</b> und Fragmentation <b>n</b> bei der Fragmentierung der Lactame bzw. . N-Formylderivate von <b>1</b> , <b>2</b> , <b>3</b> und <b>4</b> im EI-MS.....	86
Abb. 20: <sup>1</sup> H-NMR-Spektrum von <b>32</b> .....	90
Abb. 21: <sup>13</sup> C-NMR-APT-Spektrum von <b>32</b> .....	91

## Schemataverzeichnis

Schema 1: Biomimetische Umsetzung von <u>1</u> nach [4].....	21
Schema 2: Biomimetische Umsetzung von <u>2</u> nach [4].....	22
Schema 3: Biomimetische Umsetzung von <u>3</u> nach [4].....	22
Schema 4: Allgemeine Aufarbeitung der Urin- und Kotproben.....	28
Schema 5: Allgemeines Fragmentierungsmuster substituierter Benzilate.....	34
Schema 6: EI-MS-Fragmentierung von Monomethoxy- und -hydroxyphenylkationen	35
Schema 7: Fragmentierung der Piperidylreste im EI-Massenspektrometer.....	36
Schema 8: Metabolisierung von <u>1</u> .....	44
Schema 9: Metabolisierung von <u>2</u> .....	59
Schema 10: Metabolisierung von <u>3</u> .....	71
Schema 11: Metabolisierung von <u>4</u> .....	81
Schema 12: Weitere Fragmentierung des Lactamringes .....	87
Schema 13: Allgemeiner Mechanismus von Dealkylierungen am Heteroatom (X).....	93
Schema 14: Mögliche Reaktionswege zur Bildung eines Carbinolamins bei der Dealkylierung am Beispiel eines tertiären Amins.....	93
Schema 15: Möglicher Mechanismus der N-Dealkylierung.....	94
Schema 16: Reaktionsmechanismus zur Bildung von Lactamen.....	96
Schema 17: Möglicher Mechanismus des Frankfurt Shift.....	96
Schema 18: Möglicher Mechanismus zur Bildung von Phenolen (Additions-Umlagerungs-Mechanismus).....	97
Schema 19: NIH-Shift.....	98
Schema 20: Konkurrenzreaktion zum NIH-Shift.....	98
Schema 21: Reaktionswege bei der Cyt P-450 vermittelten Oxygenierung von Benzen .....	99



## Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Wöchentliches Dosierungsschema.....	25
Tab. 2: Detektierbare Substanzmenge [µg] der Ausgangsverbindungen.....	31
Tab. 3: DC, HPLC und UV-Maxima von (R,S)-N-Methyl-4-piperidyl 3,4-dimethoxy-.... benzilat ( <b>1</b> ) und Metaboliten.....	38
Tab. 4: EI-MS-Fragmente von <b>1</b> und Metaboliten.....	41
Tab. 5: Vergleich des gemessenen <sup>13</sup> C-NMR-Spektrums von <b>6</b> mit den berechneten..... Spektren isomerer Phenole.....	45
Tab. 6: DC, HPLC und UV-Maxima von (R,S)-N-Methyl-3-piperidyl 3,4-dimethoxy-.... benzilat ( <b>2</b> ) und Metaboliten.....	53
Tab. 7: EI-MS-Fragmente von <b>2</b> und Metaboliten.....	57
Tab. 8: DC, HPLC und UV-Maxima von N-Methyl-4-piperidyl 3,3'-dimethoxybenzilat ( <b>3</b> ) und Metaboliten.....	64
Tab. 9: EI-MS-Fragmente von <b>3</b> und Metaboliten.....	68
Tab. 10: DC, HPLC und UV-Maxima von (R,S)-N-Methyl-3-piperidyl 3,3'-dimethoxy-. benzilat ( <b>4</b> ) und Metaboliten.....	74
Tab. 11: EI-MS-Fragmente der Metabolite von <b>4</b> .....	78
Tab. 12: Laufhöhen verschiedener 4-Piperidyl- und 3-Piperidyl-derivate von <b>1</b> , <b>2</b> , <b>3</b> und <b>4</b> in Abhängigkeit des Fließmittels.....	85
Tab. 13: Vergleich des gemessenen <sup>13</sup> C-NMR-Spektrums von <b>32</b> mit den berechneten.... Spektren der möglichen isomeren Lactame.....	89
Tab. 14: Bedeutungen der metabolischen Abbaureaktionen bei der Biotransformation..... von <b>1</b> , <b>2</b> , <b>3</b> und <b>4</b> .....	102
Tab. 15: Vergleich der Metabolisierung und biomimetischen Umsetzung von <b>1</b> , <b>2</b> und <b>3</b> . .....	106

## Verzeichnis der verwendeten Substanzbezeichnungen (Teil I) (Teil II S. 149)

<u>1</u>	(R,S)-N-Methyl-4-piperidyl 3,4-dimethoxybenzilat
<u>2</u>	(R,S)-N-Methyl-3-piperidyl 3,4-dimethoxybenzilat
<u>3</u>	N-Methyl-4-piperidyl 3,3'-dimethoxybenzilat
<u>4</u>	(R,S)-N-Methyl-3-piperidyl 3,3'-dimethoxybenzilat
<u>5</u>	(R,S)-N-Methyl-4-piperidyl 4-hydroxy-3-methoxybenzilat
<u>6</u>	(R,S)-N-Methyl-4-piperidyl 4'-hydroxy-3,4-dimethoxybenzilat
<u>7</u>	(R,S)-N-Methyl-4-piperidyl 4,4'-dihydroxy-3-methoxybenzilat
<u>8</u>	(R,S)-4-Piperidyl 3,4-dimethoxybenzilat
<u>9</u>	(R,S)-4-Piperidyl 4-hydroxy-3-methoxybenzilat
<u>10</u>	(R,S)-4-Piperidyl 4'-hydroxy-3,4-dimethoxybenzilat
<u>11</u>	(R,S)-4-Piperidyl 4,4'-dihydroxy-3-methoxybenzilat
<u>12</u>	N-Oxid von <u>1</u> (beide Isomere)
<u>13</u>	(R,S)-N-Methyl-2-oxo-4-piperidyl 3,4-dimethoxybenzilat
<u>14</u>	(R,S)-N-Methyl-4-piperidyl 4'-hydroxy-3, 3',4'-trimethoxybenzilat
<u>15</u>	N-Methyl-4-piperidyl 4,4'-dihydroxy-3,3'-dimethoxybenzilat
<u>16</u>	(R,S)-3,4-Dimethoxybenzilsäure
<u>17</u>	(R,S)-4-Hydroxy-3-methoxybenzilsäure
<u>18</u>	(R,S)-4'-Hydroxy-3,4-dimethoxybenzilsäure
<u>19</u>	(R,S)-4,4'-Dihydroxy-3-methoxybenzilsäure
<u>20</u>	3,4-Dimethoxybenzophenon
<u>21</u>	4-Hydroxy-3-methoxybenzophenon
<u>22</u>	4'-Hydroxy-3,4-dimethoxybenzophenon
<u>23</u>	4,4'-Dihydroxy-3-methoxybenzophenon
<u>24</u>	4'-Hydroxy-3, 3',4'-trimethoxybenzophenon
<u>25</u>	(R,S)-N-Methyl-3-piperidyl 4-hydroxy-3-dimethoxybenzilat
<u>26</u>	(R,S)-N-Methyl-3-piperidyl 4'-hydroxy-3,4-dimethoxybenzilat
<u>27</u>	(R,S)-N-Methyl-3-piperidyl 4,4'-dihydroxy-3-methoxybenzilat
<u>28</u>	(R,S)-3-Piperidyl 3,4-dimethoxybenzilat
<u>29</u>	(R,S)-3-Piperidyl 4-hydroxy-3-methoxybenzilat
<u>30</u>	(R,S)-3-Piperidyl 4'-hydroxy-3,4-dimethoxybenzilat
<u>31</u>	(R,S)-3-Piperidyl 4,4'-dihydroxy-3-methoxybenzilat
<u>32</u>	(R,S)-N-Methyl-6-oxo-3-piperidyl 3,4-dimethoxybenzilat
<u>33</u>	(R,S)-N-Methyl-3-piperidyl 4'-hydroxy-3, 3',4'-trimethoxybenzilat
<u>34</u>	(R,S)-N-Methyl-3-piperidyl 4-hydroxy-3,3',4',5-tetramethoxybenzilat

## Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

Abb.	Abbildung
APT	Attached Proton Test
ATP	Adenosintriphosphat
$^{13}\text{C}$ -NMR	Kohlenstoff-13-Resonanzspektrum
COMT	Catechol-O-Methyltransferase
Cyt P-450	Cytochrom P-450
DAD	Dioden-Array-Detektor
DC/dc	Dünnschichtchromatographie/dünnschichtchromatographisch
d. Th.	der Theorie
EDTA	Ethylendiaminetetraessigsäure
EI	Elektronenstoß-Ionisation
FM	Fließmittel
F <sub>p</sub>	Schmelzbereich
GC/gc	Gaschromatographie/gaschromatographisch
$^1\text{H}$ -NMR	Protonenresonanzspektrum
HPLC/hplc	Hochleistungsflüssigchromatographie/ hochleistungsflüssigchromatographisch
IR	Infrarot
I <sub>rel.</sub>	Relative Intensität
<i>m</i>	meta
M <sup>+</sup>	Molekülradikalkation
MBTH	3-Methylbenzthiazolin-2-on-hydrazon
ME	Masseneinheiten
M <sub>r</sub>	Relative Molekülmasse
MS/ms	Massenspektrometrie/Massenspektrum/massenspektrometrisch
m/z	Masse/Ladung
NIH	National Institute of Health
NMR/nmr	Kernresonanzspektroskopie/kernresonanzspektroskopisch
<i>o</i>	ortho
<i>p</i>	para
R <sub>F</sub>	Retentionsfaktor

$R_T$	Retentionszeit
PSC	Präparative Schichtchromatographie
Tab.	Tabelle
UDP	Uridindiphosphat
UTP	Uridintriphosphat
UV	Ultraviolett
$\bar{x}$	Mittelwert

## 1 Einleitung und Problemstellung

Nahezu alle in den Körper aufgenommenen Xenobiotika unterliegen dem Stoffwechsel. Die Dauer von Arzneimittelwirkungen wird entscheidend durch das Ausmaß und die Geschwindigkeit dieser Umwandlungen bestimmt. Dabei werden die meist lipophilen Arzneistoffe zu wasserlöslichen Metaboliten abgebaut, was in der Regel einen Wirkungsverlust zur Folge hat, aber auch zu einer erhöhten Toxizität führen kann. Einige Ausgangsverbindungen (Prodrug) werden erst durch Metabolisierung zur Wirkform umgewandelt. Daraus ergibt sich ein wichtiger Aspekt in der Beurteilung neuer Arzneistoffe im Rahmen des geforderten Zulassungsverfahrens, das die Überprüfung derartiger Zusammenhänge an geeigneten Tierspezies und später auch am Menschen fordert. Die in den letzten Jahren etablierten *in vitro*- und chemischen Modellsysteme können die *in vivo*-Studien ergänzen, aber in ihrer Vollständigkeit nicht ersetzen.

Biotransformationsreaktionen werden in Phase-I- und Phase-II-Reaktionen eingeteilt. Dabei können Phase-I-Reaktionen durch oxidative, reduktive und/oder hydrolytische Veränderungen des Moleküls eine Erhöhung der Hydrophilie bewirken, die, gefolgt von Konjugationsreaktionen mit körpereigenen Substanzen in Phase II, zu einer verbesserten Ausscheidung führt. In letzter Zeit erfolgte eine Erweiterung dieser Einteilung mit den Phase-III-Reaktionen [1, 2]. Diese berücksichtigt weitere Umformungsreaktionen, die beispielsweise durch Darmbakterien und Mukosaenzyme verursacht werden können oder als Hydrolysen von Glucuronsäure- und Sulfatkonjugaten während des enterohepatischen Kreislauf auftreten.

Die Parkinson-Krankheit gehört zu den gegenwärtig am intensivsten beforschten Krankheitsbildern. Aufgrund einer Degeneration dopaminerger Neurone in der Substantia nigra kommt es zu einer Verarmung des Striatums an Dopamin. Für den Patienten bedeutet dies eine zunehmende Einschränkung seiner Beweglichkeit, die sich besonders in Rigor, Tremor und Akinese äußert. Therapien können im Moment das Krankheitsbild nur verbessern. Eine Heilung wird es auch in absehbarer Zukunft nicht geben.

Auf der Suche nach geeigneten Antiparkinsonika gelang es in unserem Arbeitskreis, neue basische Benzilsäureester mit einer teilweisen dualistischen anticholinergen und dopaminergen Wirksamkeit zu synthetisieren [3]. In Ergänzung zu den

pharmakologischen Testungen soll nun beispielhaft die Metabolisierung für einige dieser Benzilsäurederivate in der Ratte untersucht werden. Dadurch sollen typische Biotransformationswege und Abbaumechanismen für basische an den Aromaten substituierte Benzilate im Körper aufgezeigt und eventuelle Regelmäßigkeiten erkannt werden. Diese Ergebnisse sollen mit Metabolisierungsstudien verwandter Benzilate verglichen werden. Eine kurze Einschätzung der identifizierten Metabolite hinsichtlich ihrer möglichen Antiparkinsonwirksamkeit soll die Betrachtungen ergänzen.

Zu diesem Zweck wurden vier strukturisomere Benzilsäureester ausgewählt, von denen jeweils zwei eine einheitliche alkoholische Komponente bzw. die gleiche aromatische Substitution aufweisen. Folgende Verbindungen sollen untersucht werden:

- (R,S)-N-Methyl-4-piperidyl 3,4-dimethoxybenzilat (**1**)
- (R,S)-N-Methyl-3-piperidyl 3,4-dimethoxybenzilat (**2**)
- N-Methyl-4-piperidyl 3,3'-dimethoxybenzilat (**3**)
- (R,S)-N-Methyl-3-piperidyl 3,3'-dimethoxybenzilat (**4**).

Nach Festlegung eines geeigneten Dosierungsschemas für die Ratten ist das Ziel, eine Reinigungsmethode für das biologische Material (Urin, Kot) zu entwickeln. Aus den Extrakten sollen die Metabolite möglichst schnell, effizient und schonend isoliert und mit geeigneten Methoden analytisch charakterisiert werden. Metabolite, deren Struktur aufgrund unzureichender analytischer Aussagen nicht sicher aufgeklärt werden kann, sollen durch synthetisierte Vergleichssubstanzen identifiziert werden. Um die möglichen Biotransformationswege zu vervollständigen, werden die Extrakte nach Konjugatspaltung auf Phase-II-Metabolite hin untersucht.

In der letzten Zeit hat sich die Biomimetik als chemisches Modell zur Aufklärung von Biotransformationswegen und -mechanismen immer weiter durchgesetzt. Dabei wurden auch Studien an verschiedenen Benzilaten, u. a. an **1**, **2** und **3** [4], durchgeführt. Diese Ergebnisse sollen mit den hier erarbeiteten *in vivo*-Untersuchungsergebnissen verglichen werden, um ihre Eignung zur Biotransformationssimulation kritisch zu beurteilen.

## 2 Biotransformation und biomimetische Umsetzung von Benzilaten - Literaturübersicht

Erste Ergebnisse zur Metabolisierung von Benzilaten wurden 1960 durch BECKMANN veröffentlicht [5]. In der Studie wurde das Verhalten von *Piribenzil-methylsulfat* [Benzilsäure-(N,N-dimethyl-2-hydroxymethyl-piperidinium)-ester methylsulfat] in der Ratte und im menschlichen Organismus untersucht (Abb. 1).

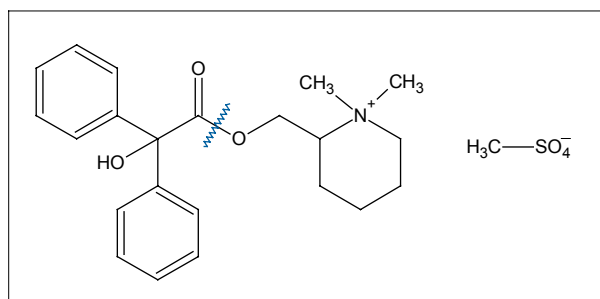


Abb. 1: Piribenzil-methylsulfat (Metabolisierung in der Ratte und im Menschen)

Neben unveränderter Ausgangssubstanz und dem quartären Ammoniumalkohol im Rattenkot wurde im Urin zusätzlich unveränderte Benzilsäure gefunden. Mit der Galle ist ausschließlich hydrolysierte Substanz eliminiert worden.

Bei der Untersuchung der Biotransformation von *Benactyzin* ( $\beta$ -Diethylaminoethyl benzilat) in der Ratte wurde als Hauptmetabolisierungsprodukt Benzilsäure identifiziert (Abb. 2) [6]. Außerdem konnten noch unveränderte Substanz und das Dealkylierungsprodukt  $\beta$ -Ethylaminoethyl benzilat nachgewiesen werden.

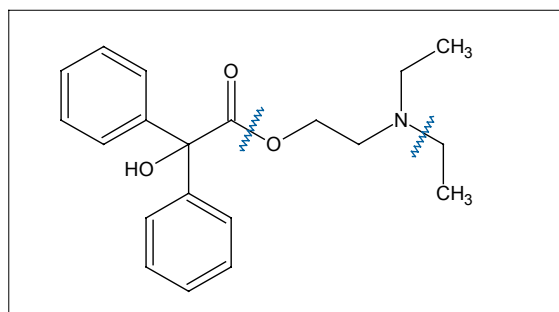


Abb. 2: Benactyzin (Metabolisierung in der Ratte)

Mit *Benapryzin* (N-Ethyl-N-propyl-aminoethyl benzilat) wurde ein weiterer Benzilsäureester hinsichtlich seiner Metabolisierung im Menschen und in der Ratte untersucht (Abb. 3) [7].

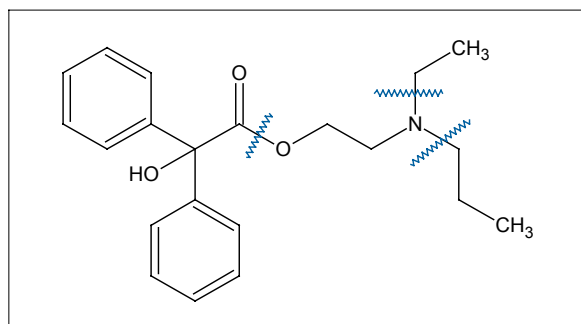


Abb. 3: Benapryzin (Metabolisierung in der Ratte und im Menschen)

Es konnte keine Ausgangssubstanz wiedergefunden werden. Als Hauptprodukt der Biotransformation wurde Benzilsäure identifiziert. Zusätzlich wurden die Hydrolyse- und Dealkylierungsprodukte Ethylpropylaminoethanol, Propylaminoethanol und Ethylaminoethanol nachgewiesen.

Zur Biotransformation von *Propiverin* (N-Methyl-4-piperidinyll *O*-propylbenzilat) liegen verschiedene Veröffentlichungen vor (Abb. 4) [8, 9]. Im Urin der Ratte konnten hauptsächlich Benzilsäure, N-Methyl-4-piperidyl benzilat, *O*-n-Propylbenzilsäure und ein Lacton (2,2-Diphenyl-5-methyl-1,4-dioxan-3-on), das wahrscheinlich als Metabonat über die *O*-(2-Hydroxypropyl)benzilsäure entsteht, nachgewiesen werden. Weiterhin wurden das Propiverin-N-Oxid, das N-Oxid von N-Methyl-4-piperidyl benzilat, ein seitenkettenhydroxyliertes Produkt, 4-Hydroxybenzophenon und Benzilsäureethylester als Artefakt identifiziert [9, 10, 11]. Bei Untersuchungen an Affe und Hund kam man mit Ausnahme des Fehlens vom Lactons zu gleichen Ergebnissen [9].

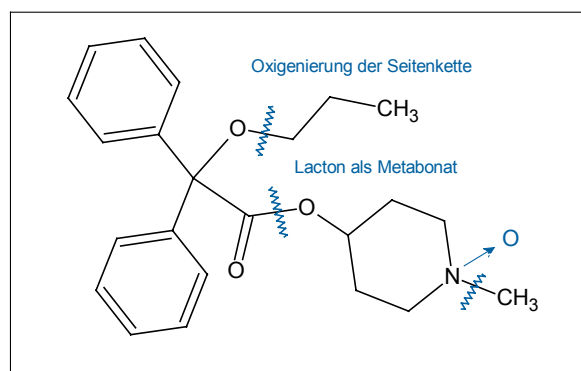


Abb. 4: Propiverin (Metabolisierung in der Ratte und im Menschen)

N-Dealkylierte Verbindungen und Diphenylelessigsäurestrukturen konnten nicht nachgewiesen werden. Auch die Entstehung phenolischer Produkte wurde nicht beobachtet. Die Bildung von 4-Hydroxybenzophenon konnte widerlegt werden [8]. Als



Hauptmetabolisierungswege von Propiverin im Tier werden die Spaltung des Esters, oxidative O-Dealkylierungen der Seitenkette und Oxigenierung der Propylseitenkette angesehen.

Im Vergleich dazu wurde das Metabolitenspektrum von Propiverin im Menschen und in adulten und fetalen Humanlebermikrosomen untersucht. Dabei wurden Benzilsäure, N-Methyl-4-piperidyl benzilat und -N-Oxid, die N-Demethylverbindung und das N-Oxid von Propiverin, O-n-Propylbenzilsäure, 4-Piperidyl benzilat, das oben beschriebene Lacton, weitere seitenkettenhydroxylierte Produkte, Piperidin-4-ol, N-Methylpiperidin-4-ol und -N-oxid sowie weitere Oxigenierungsprodukte der Seitenkette nachgewiesen [8, 12, 13, 14, 15, 16]. Als Ergebnis von Konjugationsreaktionen wurden verschiedene Glucuronide isoliert. Neben unveränderter Ausgangssubstanz konnten große Mengen an N-Methyl-4-piperidyl benzilat bestimmt werden. Auch beim Menschen konnten keine aromatischen C-Oxigenierungen und Reduktionen zu Diphenylessigsäurederivaten nachgewiesen werden.

Eine Ergänzung zu den Biotransformationsuntersuchungen von Propiverin am Tier und Menschen stellte die biomimetische Umsetzung der Substanz dar [8]. Dabei wurden das N-Oxid und die N-Demethylverbindung von Propiverin, die O-n-Propylbenzilsäure, N-Methyl-4-piperidyl benzilat, Benzilsäure, Benzophenon und 4-Hydroxybenzophenon isoliert und identifiziert. Somit erfolgte anhand dieses chemischen Modells, in Übereinstimmung zum tierischen und menschlichen Organismus, die Simulierung der Funktionalisierungsreaktionen N-Oxidation, N-Demethylierung, Ether- und Ester-spaltung.

Eine weitere Untersuchung beschäftigte sich speziell mit der Biotransformation des Hauptmetaboliten von Propiverin – dem *N-Methyl-4-piperidyl benzilat* - in der Ratte (Abb. 5) [10]. Dabei wurde als Hauptmetabolit Benzilsäure identifiziert. Weiterhin traten neben Ausgangssubstanz das N-Oxid-Isomer, wenig N-Demethylierungsprodukt und 4-Hydroxybenzophenon auf.

Auch beim N-Methyl-4-piperidyl benzilat wurden biomimetische Untersuchungen durchgeführt [8]. Es konnten in Analogie zur *in vivo*-Studie N-Oxid, N-Demethylierungsprodukt, Benzilsäure und 4-Hydroxybenzophenon gefunden werden. Zusätzlich traten noch weitere am Aromaten hydroxylierte Benzilsäuren und Benzophenone auf.

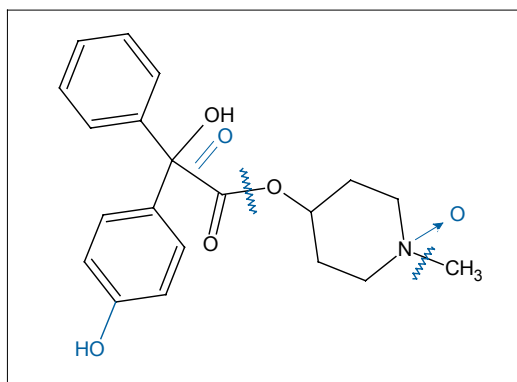


Abb. 5: N-Methyl-4-piperidyl benzilat (Metabolisierung in der Ratte)

Strukturell eng verwandt sind das *(R,S)*-N-Ethyl-3-piperidyl benzilat und das *(R,S)*-N-Methyl-4-piperidyl 4-methoxybenzilat (Abb. 6). Die Biotransformation des ersteren wurde von CHEN et al. in der Ratte untersucht [17]. Dabei wurde neben den Hydrolyseprodukten zusätzlich die N-Deethylverbindung identifiziert. Beim substituierten 4-Methoxybenzilat konnte ein nahezu vollständiger Abbau in der Ratte beobachtet werden [18]. Als Metabolisierungswege traten N-Oxidbildung, N-Dealkylierung, Esterspaltung zu Benzilsäuren, Etherspaltung an der Methoxygruppe und die Oxidation zum Benzophenon auf. Außerdem konnten aromatische C-Oxygenierungen und die Bildung der 4-Methoxydiphenyllessigsäure nachgewiesen werden.

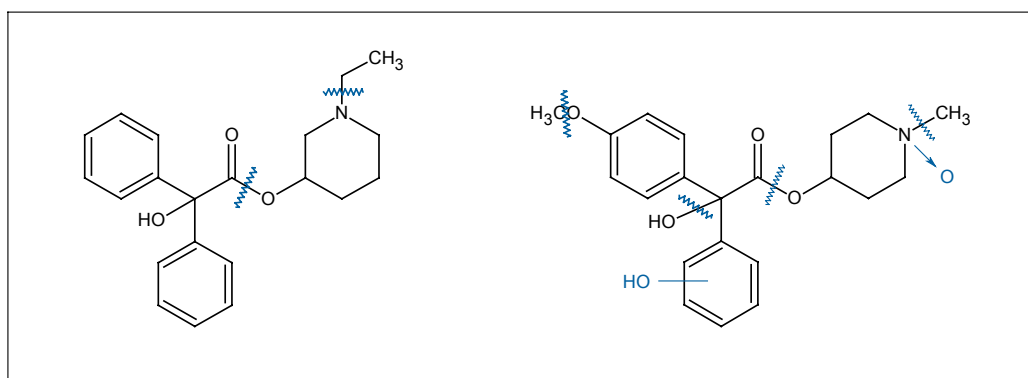


Abb. 6: N-Ethyl-3-piperidyl benzilat, *(R,S)*-N-Methyl-4-piperidyl 4-methoxybenzilat (Metabolisierung in der Ratte)

*(R,S)*-N-Methyl-4-piperidyl 4-methoxybenzilat wurde ebenfalls einer biomimetischen Untersuchung unterzogen [8]. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus der Biotransformationsuntersuchung an der Ratte konnten N-Oxidbildung, N-Dealkylierung, Esterspaltung, Methoxygruppenspaltung und Oxidation zum Benzophenon beobachtet werden. Außerdem erfolgte eine zusätzliche Hydroxylierung am

substituierten aromatischen Ring.

Das Spasmolytikum *Denaverin* (2-Dimethylaminoethyl *O*-(2-ethylbutyl)-benzilat] wurde in verschiedenen Studien hinsichtlich seiner Metabolisierung untersucht (Abb. 7) [19, 20, 21].

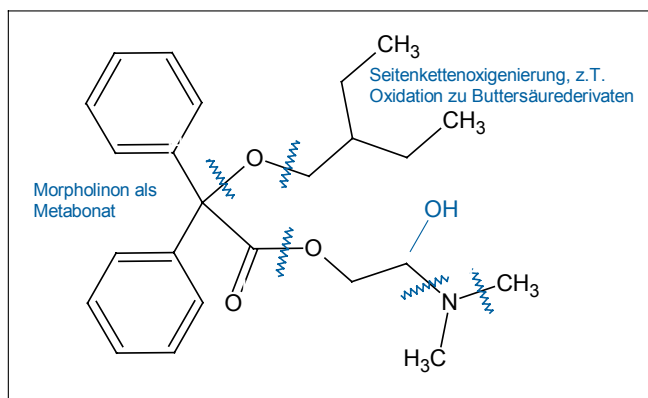


Abb. 7: Denaverin (Metabolisierung in der Ratte und im Menschen)

In der Ratte wurde von LISOWSKI die Bildung von Benzilsäure als Hauptmetaboliten, eine Demethylierung des basischen Esters und die Entstehung von Diphenylelessigsäure und deren Dimethylaminoethylester beobachtet [19]. Zusätzlich trat in größeren Mengen das 3,3-Diphenylmorpholin-2-on, vermutlich als Metabonat, auf.

Beim Menschen wurden Veränderungen in den Seitenketten beobachtet [21]. Die Mehrzahl der Metabolite weist eine 2-Hydroxyethylesterstruktur auf. Dabei traten in der Esterkette eine Demethylierung mit nachfolgender Deaminierung und Hydroxylierung auf. In der Etherseitenkette wurden verschiedene Oxigenierungen mit z. T. nachfolgender Oxidation bis zu Buttersäurederivaten beobachtet, die meist nur in Form ihrer Glucuronide isoliert werden konnten. Außerdem wurden das 2-Hydroxyethylbenzilat und der durch Reduktion gebildete entsprechende Diphenylelessigsäureester nachgewiesen. Phenolische Produkte traten weder bei der Ratte noch beim Menschen in Erscheinung.

Zusätzlich zu den Versuchen am lebenden Organismus erfolgte eine vergleichende Umsetzung in einer biomimetischen Studie [4]. Dabei wurden als Produkte das N-Oxid, die N-Formylverbindung und die N-Demethylverbindung von Denaverin identifiziert. Weiterhin wurden Ester- und Etherspaltung beobachtet. Auch *o*-hydroxylierte Produkte konnten nachgewiesen werden. Es wurden zwar in Übereinstimmung zu den Untersuchungen an Ratte und Mensch Metabolite isoliert, die durch Ester- und Etherspaltung und Deaminierung entstanden sind, allerdings erwies sich die

Mannigfaltigkeit der Hydroxylierungen in den Seitenketten beim Menschen als nicht simulierbar.

Mit *Epicainid* (N-[(1-Ethyl-pyrrolidin-2-yl)methyl] benzilamid) wurde ein antiarrhythmisch wirkendes Benzilamid in der Ratte und im Menschen hinsichtlich seiner Metabolisierung untersucht (Abb. 8) [22].

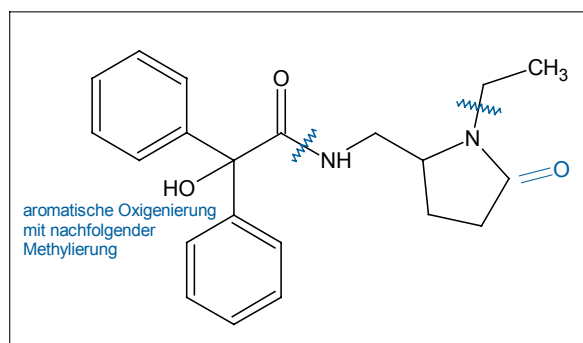


Abb. 8: Epicainid (Metabolisierung in der Ratte und im Menschen)

In der Ratte stellte die aromatische Oxigenierung den Hauptbiotransformationsweg dar. Neben 3-Hydroxy-4-methoxyepicainid konnten weiterhin 4-Hydroxy-, 3,4-Dihydroxy- und 3,4'-Dihydroxy-4-methoxyverbindungen nachgewiesen werden. Beim Menschen blieb das aromatische Ringsystem dagegen unverändert. Hauptmetaboliten wurden durch N-Deethylierung und Lactamisierung gebildet. Außerdem erfolgte eine Amidspaltung und Bildung von Benzilsäure. Ein Teil der Metabolite wurde als Konjugat ausgeschieden.

*Trospiumchlorid* (3 $\alpha$ -Benziloyloxynortropan-8-spiro-1'-pyrrolidinium chlorid), eingesetzt vor allem bei Harninkontinenz, wird beim Menschen fast unverändert ausgeschieden (Abb. 9) [23, 24, 25, 26].

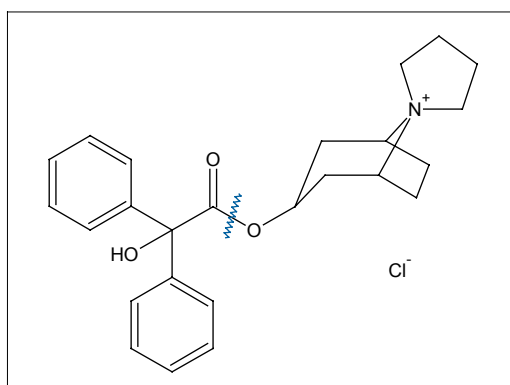
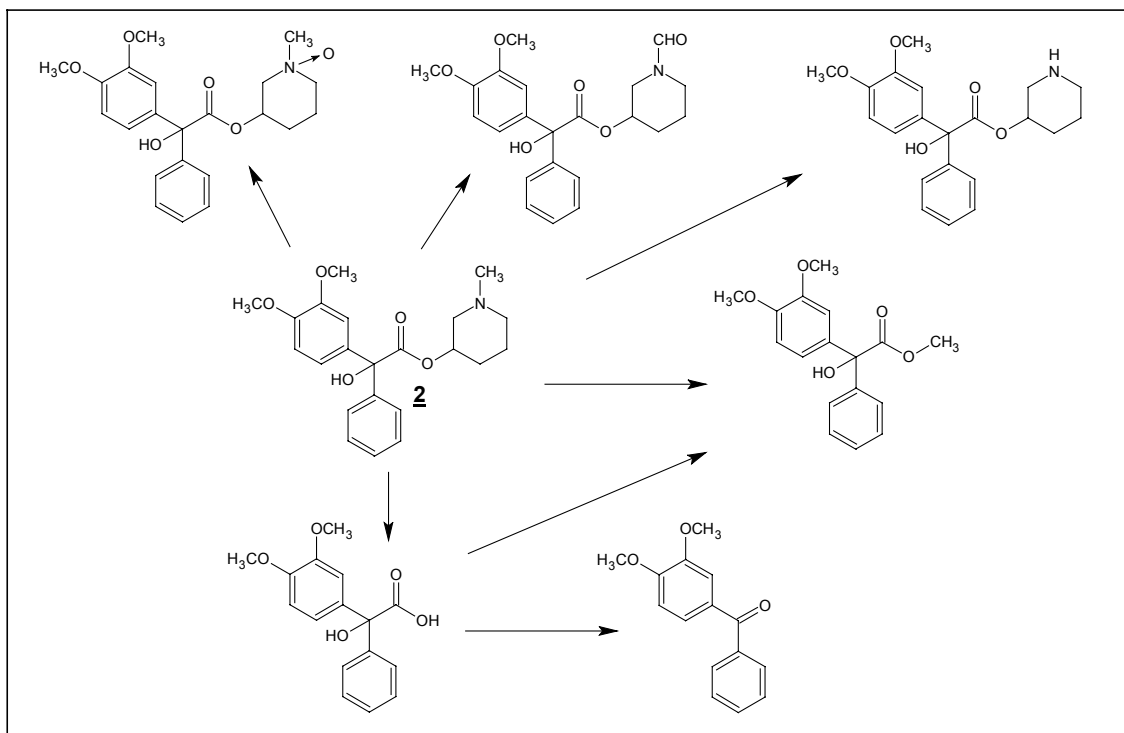


Abb. 9: Trospiumchlorid (Metabolisierung im Menschen)

Als Metabolite konnten nur die Hydrolyseprodukte gefunden werden.

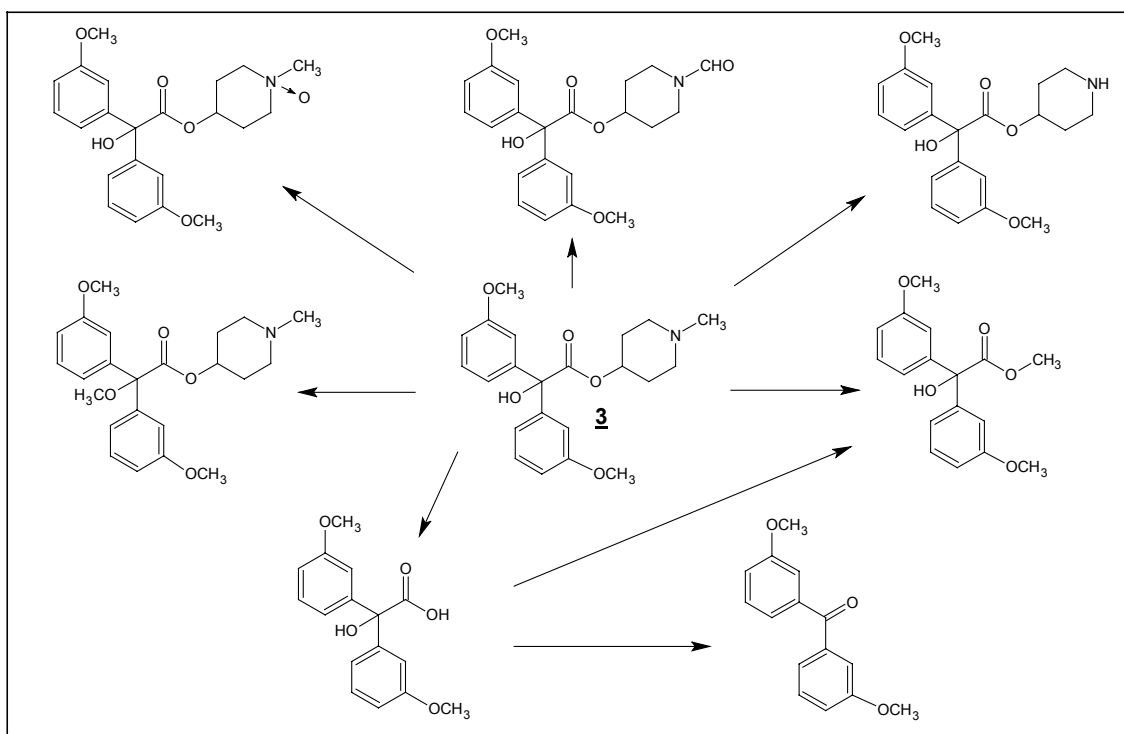
The reaction scheme illustrates the synthesis of compound **1** and its subsequent transformations. Compound **1** is a p-methoxyphenyl-substituted piperidine derivative. It can be converted to a p-methoxyphenyl-substituted piperidine derivative with a methyl group on the nitrogen, a p-methoxyphenyl-substituted piperidine derivative with a formyl group on the nitrogen, or a p-methoxyphenyl-substituted piperidine derivative with a hydroxyl group on the nitrogen. Compound **1** can also be converted to a p-methoxyphenyl-substituted piperidine derivative with a methyl group on the nitrogen, a p-methoxyphenyl-substituted piperidine derivative with a formyl group on the nitrogen, or a p-methoxyphenyl-substituted piperidine derivative with a hydroxyl group on the nitrogen. Compound **1** can also be converted to a p-methoxyphenyl-substituted piperidine derivative with a methyl group on the nitrogen, a p-methoxyphenyl-substituted piperidine derivative with a formyl group on the nitrogen, or a p-methoxyphenyl-substituted piperidine derivative with a hydroxyl group on the nitrogen.

Entsprechend den unterschiedlichen Substitutionsmustern von **2** und **3** ergeben sich die in Schema 2 und 3 dargestellten Produktspektren.



Schema 2: Biomimetische Umsetzung von **2** nach [4]

Das 3-Piperidylderivat **2** erwies sich gegenüber oxidativen Angriffen stabiler als **1** und **3**, was sich in einem eingeschränkten Produktspektrum mit geringerer Ausbeute ausdrückte.



Schema 3: Biomimetische Umsetzung von **3** nach [4]

Aus den bisher durchgeführten Biotransformationsuntersuchungen an Benzilsäurederivaten können kaum Voraussagen für weitere Studien ähnlicher Strukturen getätigt werden. Einen generellen Metabolisierungsweg stellt die Hydrolyse zur Benzilsäure dar. Beim Menschen erfolgt die Verstoffwechselung bevorzugt im nichtaromatischen Teil des Moleküls, während bei der Ratte die ganze Verbindung Veränderungen erfährt. Die Biomimetik kann hier als Erkundungsmethode insbesondere zur Synthese von Vergleichssubstanzen dienen. Sie führt vor allem in den Seitenketten und nicht im aromatischen Bereich des Moleküls zu Strukturveränderungen, hat bisher aber besonders Probleme in der Simulierung von C-Oxygenierungen gezeigt.

### 3 Untersuchungen und Ergebnisse

Über die unterschiedlich ausgeprägten pharmakologischen Wirksamkeiten von substituierten basischen Benzilsäureestern, die als potentielle neue Wirkstoffe zur Therapie des Morbus Parkinson synthetisiert worden waren [3], lagen zu Beginn der Versuche noch keine Ergebnisse vor. Eine Auswahl wurde in Analogie von parallel durchgeführten biomimetischen Untersuchungen an Benzilaten getroffen [4], wo drei verschiedene Benzilsäureester untersucht wurden. Die Verbindungen unterscheiden sich durch die Substitution von Methoxygruppen an den aromatischen Ringen (3,4-Position oder 3,3'-Position) und bei einer Substitution in 3,4-Position im basischen Aminoalkohol (N-Methyl-4-piperidinol oder N-Methyl-3-piperidinol) – Verbindung **1**, **2** und **3**. Um die Ergebnisse zu vervollständigen, wurde für die Untersuchung zur Biotransformation zusätzlich zu diesen drei Verbindungen der in 3,3'-Position dimethoxylierte N-Methyl-3-piperidinyl benzilsäureester herangezogen – Verbindung **4**.

#### 3.1 Applikationsdosis, Eliminationsdauer und Dosierungsschema

Zu Beginn der Metabolismusstudien am Tier lagen keine Angaben zu den letalen Dosierungen der Verbindungen **1**, **2**, **3** und **4** vor. Daher wurden die Daten des verwandten Benzilates (R,S)-N-Methyl-4-piperidyl 4-methoxybenzilat zur Orientierung herangezogen, bei dem eine Dosierung von 150 mg/kg Körpergewicht der Ratte gewählt worden war [18]. Zunächst wurde eine Dosis von 50 mg/kg des Hydrochlorids mittels Schlundsonde an eine Ratte verabreicht und das Befinden des Tieres beobachtet. Bei allen vier Benzilaten wurde eine leichte Mydriasis beobachtet, aber es traten keine toxischen Symptome wie Sedierung, Relaxation oder motorische Störungen auf. Eine Erhöhung der Dosierung zunächst auf 100 mg/kg und dann auf 200 mg/kg führte zwar zu einer verstärkten und länger anhaltenden Mydriasis aber zu keinen Intoxikationserscheinungen. Wie spätere pharmakologische Untersuchungen von **1** an der Maus bestätigen, tritt Mydriasis bereits bei geringer Dosis auf, während toxische Anzeichen erst bei einer weitaus höheren Dosierung auftreten [3]. Für die weiteren Untersuchungen wurde deshalb die Dosis von 200 mg/kg des entsprechenden Benzilsäureesterhydrochlorids gewählt, mit der aus der Erfahrung heraus ausreichende Metabolitenmengen isoliert werden können. Auf eine weitere Erhöhung der Dosierung



wurde verzichtet, um die noch größere Belastung der Tierorganismen zu vermeiden. Zusätzlich wurden in den einzelnen Versuchsreihen weiterhin Ratten mit einer Dosierung von 50 mg/kg und 100 mg/kg behandelt, um eventuelle Unterschiede der Biotransformation in verschiedenen Dosierungen aufzuzeigen, die z. B. auch durch eine zu hohe Belastung des Organismus mit einer Substanz auftreten können.

Zur Ermittlung des optimalen Sammelzeitraumes wurden die Ausscheidungsprodukte der Tiere nach Applikation von 200 mg/kg der jeweiligen Substanz über einen Zeitraum von 72 h gesammelt und mittels DC und HPLC überprüft. Danach wird der Hauptanteil der Metaboliten bei allen vier Verbindungen innerhalb der ersten 24 h ausgeschieden. Nach 48 h können nur noch geringe Metabolitenmengen, nach 72 h nur noch Spuren nachgewiesen werden. Für die Untersuchungen wurden daher die Fraktionen des ersten (24 h) und des zweiten Tages (48 h) getrennt gesammelt und analysiert.

Die orale Applikation der wässrigen Lösungen der Benzilsäurester erfolgte mittels Schlundsonde in den Magen der Tiere. Für jede Verbindung standen 16 Ratten zur Verfügung, wobei jeweils 4 Ratten eine wirkstofffreie Lösung erhielten und den Leerurin lieferten. Die Tiere wurden während der Versuche in Stoffwechselkäfigen gehalten, so dass eine getrennte Sammlung von Urin und Kot ermöglicht wurde. Die Gabe der Substanzen an die Ratten erfolgte im wöchentlichen Rhythmus. Dies gewährleistete eine Ruhezeit von 5 Tagen, und es konnten jeweils zwei Verbindungen gestaffelt in der Woche (Montag oder Mittwoch) verabreicht werden. Die Auswahl der Dosierungen für die einzelnen Tiere erfolgte nach einem sich wöchentlich verschiebenden Schema, so dass die Ratten die gleiche Anzahl an Applikationen mit Substanz und Placebo erhielten (Tab. 1).

Tab. 1: Wöchentliches Dosierungsschema

Woche	Ratten			
	1-4	5-8	9-12	13-16
1	Placebo	50 mg/kg	100 mg/kg	200 mg/kg
2	200 mg/kg	Placebo	50 mg/kg	100 mg/kg
3	100 mg/kg	200 mg/kg	Placebo	50 mg/kg
4	50 mg/kg	100 mg/kg	200 mg/kg	Placebo

## **3.2 Aufarbeitung des biologischen Materials**

### **3.2.1 Vergleich verschiedener Aufarbeitungsmethoden**

Einen limitierenden Faktor in Biotransformationsuntersuchungen stellt die trotz Aufarbeitung immer noch hohe Belastung der Proben an biologischem Material dar. Weiterhin geht bei der Aufarbeitung ein zusätzlicher Teil der von vornherein schon geringen Mengen an Metaboliten verloren. Mit Hilfe der Kopplung von HPLC oder GC mit der MS zur Identifizierung kann man diese Probleme einigermaßen umgehen, hat dann aber kaum Möglichkeiten, die Metaboliten in ausreichenden Mengen zu isolieren, um sie einer weiteren analytischen Charakterisierung zu unterziehen. Es gilt also, ein möglichst schnelles, ökonomisches und substanzschonendes Reinigungs- und Trennsystem zu finden.

Zu den häufigsten Methoden der Reinigung von biologischem Material gehören die Extraktion mit organischem Lösungsmittel und der Gebrauch von Adsorbentien. Zur Beurteilung der Eignung für die Aufarbeitung der Proben von **1**, **2**, **3** und **4** wurden drei verschiedene Extraktionsmethoden miteinander verglichen. Als Kriterien galten die Wiederfindungsrate (s. 5.3.3.1) und die jeweilig verbleibenden Probenverunreinigungen an biologischem Material. Dafür wurde eine bestimmte Menge des jeweiligen Hydrochlorids des Benzilates in Eigenurin gelöst und mit den folgenden Methoden gereinigt. Die Wiederfindung und der Grad der Verunreinigungen wurden mit Hilfe der HPLC bestimmt. Die Verunreinigungen konnten weiterhin per DC und visuell beurteilt werden.

Zur Flüssigextraktion wurden verschiedene Lösungsmittel gewählt. Dabei konnten mit Dichlormethan und Essigsäureethylester Wiederfindungsraten von ca. 90 % für **1** und **2** und ca. 80 % für **3** und **4** erzielt werden. Allerdings war der Anteil an biologischen Verunreinigungen noch sehr hoch. Weitere Nachteile dieser Methode bildeten der hohe Verbrauch an Lösungsmitteln und eine schlechte Phasentrennung, die eine Zentrifugation nötig machte.

Als weiteres Verfahren der Flüssig-Flüssig-Extraktion wurde die Reinigung über Extrelut®-Säulen geprüft. Als Matrix dient hier ein besonders aufgearbeitetes inertes Kieselgur mit hohem Porenvolumen, um das sich die wässrige Phase wie ein Film legt. Diese kann nun nachfolgend mit organischem Lösungsmittel extrahiert werden. Vorteile bestehen in einem kleinen Zeitaufwand und geringem Lösemittelverbrauch. Das Eluat

ist frei von Emulsionen. Die Wiederfindungsrate betrug für 1 und 2 mit Essigsäureethylester nahezu 100 %, für 3 95 % und für 4 90 %. Die Proben waren noch immer mit biologischem Material durchsetzt, aber in einem wesentlich geringerem Maße als bei der ersten Methode der Flüssigextraktion.

Als drittes Verfahren wurde eine Flüssig-Fest-Extraktion über das Austauscherharz Amberlite® XAD 2 gewählt. Dabei konnte für 1 die beste Wiederfindung mit 41 % bestimmt werden. Die verbleibenden Verunreinigungen mit biologischem Material waren wenig zufriedenstellend. Auf weitere diesbezügliche Optimierungsversuche wurde verzichtet, da die Resultate mit Extrelut® befriedigend waren. Es wurde entschieden, die folgenden Aufarbeitungen mit Hilfe dieser letztgenannten Flüssig-Flüssig-Extraktion vorzunehmen.

### **3.2.2 Reinigung der Proben**

(vgl. 5.3.3.2)

Das bei - 20 °C aufbewahrte biologische Material wurde bei - 80 °C tiefgefroren und einer Lyophilisation unterzogen. Die gefriergetrockneten Proben wurden mit 30 °C warmen Methanol erschöpfend extrahiert und bei 30 °C eingeeengt.

Die Aufnahme der Rückstände erfolgte in einer Wassermenge, die einem Drittel der ursprünglichen Urinmenge bzw. Kotmenge entsprach. Die Vorreinigung über Extrelut®-Säulen verbunden mit saurer und basischer Elution lieferte die beiden Fraktionen der unkonjugierten Metaboliten. Im sauren Extrakt erhält man Säuren und Neutralstoffe. Der in der basischen Fraktion durch Ammoniak erreichte pH-Wert von 9 hat den Vorteil, dass neben basischen Verbindungen auch Phenolbasen, die als Metabolite sehr wahrscheinlich sind, eluiert werden können. In den wiedergewonnenen wässrigen Lösungen erfolgte die Konjugatspaltung durch Inkubation bei pH 5 mit dem Enzymgemisch  $\beta$ -Glucuronidase/Arylsulfatase bei 37 °C innerhalb von 24 Stunden. Diese Lösungen wurden ebenfalls über Extrelut®-Säulen, wie beschrieben, aufgearbeitet und die sauren und basischen Metabolitenfraktionen der ursprünglichen Konjugate erhalten. (vgl. Schema 4)

### Lyophilisat

- Extraktion mit Methanol
- Einengung der Extrakte und Aufnahme in Wasser, anschließendes Ansäuern
- Einwirken auf Extrelut<sup>®</sup>-Säule
- Elution mit Essigsäureethylester



Einengen und Aufnahme in Methanol



Säule mit NH<sub>3</sub>-Dampf äquilibrieren

### Saure unkonjugierte Fraktion



Elution mit Dichlormethan/Isopropanol



Einengen und Aufnahme in Methanol



Wiedergewinnung der wässrigen Probelösung



Konjugatspaltung



Ansäuern und Einwirken auf Extrelut<sup>®</sup>



Elution mit Essigsäureethylester



Einengen und Aufnahme in Methanol



Säule mit NH<sub>3</sub>-Dampf äquilibrieren



### Saure konjugierte Fraktion

Elution mit Dichlormethan/Isopropanol



Einengen und Aufnahme in Methanol

### Basische konjugierte Fraktion

Schema 4: Allgemeine Aufarbeitung der Urin- und Kotproben

### **3.2.3 Isolierung der Metabolite**

Zur Isolierung der Metabolite standen zwei Verfahren zur Verfügung – die präparative HPLC und die präparative DC. Die präparative HPLC erwies sich jedoch gegenüber der DC hinsichtlich Trennleistung, Lösemittelverbrauch und Zeitaufwand als nachteilig. Durch Variation der Fließmittelgemische bei der DC konnten die Metabolite gut getrennt werden. Zur Separation wurden neben Dickschichtchromatographieplatten analytische DC-Alufolien benutzt, bei denen die Isolierung durch nachfolgendes Ausschneiden der Banden erfolgte. Vorteil dieser präparativen DC-Methode stellt eine wesentlich bessere und klarere Trennung der Banden dar. Durch Methanolextraktion wurden die einzelnen Metabolite von der Kieselgelschicht gelöst und den analytischen Methoden zugeführt. Auf diese Weise konnten die Metabolite der jeweiligen basischen und sauren Fraktionen gewonnen werden.

### 3.3 Analytische Charakterisierung der Metabolite

#### 3.3.1 DC-Untersuchungen

(vgl. 5.4.1)

Die DC dient in Biotransformationsstudien sowohl der Trennung als auch der qualitativen Analyse der Metabolite. Insbesondere die Detektierbarkeit von Substanzen lässt Schlüsse auf bestimmte Strukturelemente in den Verbindungen zu.

Die untersuchten Benzilate und ihre Metabolite wurden mit Hilfe von vier verschiedenen Detektionsmitteln charakterisiert. Zur Identifizierung der Substanzbanden wurde die Löschung des UV-Lichtes bei 254 nm auf DC-Platten mit Fluoreszenzindikator ausgewertet. Diese Fluoreszenzlöschung haben alle Benzilsäurederivate aufgrund der aromatischen Struktur gemein.

Eine positive Reaktion mit DRAGENDORFF-Reagenz spricht für das Vorhandensein eines basischen Alkaloidrestes. Auf diese Weise können die basischen Benzilsäureester von den Benzilsäuren und Benzophenonen unterschieden werden. Die nach Esterspaltung entstehenden Aminoalkohole, die mit DRAGENDORFF-Reagenz in einer blauvioletten Farbe detektierbar sind, wurden in keiner der Untersuchungen, vermutlich aufgrund eines schnellen Abbaus im Körper, nachgewiesen.

Die Fleckenfarbe nach Detektion mit konzentrierter Schwefelsäure gibt Auskunft über die Substitution an den aromatischen Ringen von Benzilsäurederivaten. Die Reaktionsmechanismen sind dabei nicht geklärt. Bei der Metabolisierung von **1** und **2** (3,4-Dimethoxystruktur) bedeutet eine braune Färbung in der Kälte und eine hellblaue in der Hitze einen unsubstituierten zweiten aromatischen Ring. Eine Methoxygruppenspaltung zeigt dabei keinen Einfluss auf die Färbung. Eine violette Färbung in der Kälte hingegen weist auf eine Hydroxylierung am vorher unsubstituierten Ring hin. Bei einer Zweifach-Substitution am ursprünglich unsubstituierten Phenylring tritt eine blaue Farbe auf. Alle Benzophenonderivate führen mit Schwefelsäure sowohl in der Kälte als auch in der Hitze zu einer gelben Färbung.

Anders reagieren dagegen die Metabolite von **3** und **4** (3,3'-Dimethoxystruktur) mit Schwefelsäure. Eine grüne Färbung in der Kälte und eine graue in der Hitze sind typisch für Benzilsäurederivate mit einer 3,3'-Dimethoxysubstitution, wobei eine Methoxygruppenspaltung konzentrationsabhängig zu einem orangen Kern innerhalb dieser Grünfärbung führt. Gleiche Reaktion zeigen Metabolite mit einer zusätzlichen

phenolischen Hydroxylgruppe. Eine blaugrüne Färbung hingegen bedeutet eine Spaltung beider Methoxygruppen zum 3,3'-Dihydroxybenzilsäureester. Ein blauer Fleck weist, ähnlich wie bei den Metaboliten von **1** und **2** beobachtet, auf eine Zweifach-Substitution an jedem der beiden Phenylringe hin. Benzophenonderivate reagieren mit Schwefelsäure in einer Gelbfärbung der Substanzbanden.

Da alle Metabolite mit konzentrierter Schwefelsäure und nachfolgendem Erhitzen auf der Heizplatte detektierbar sind, wurden die orientierenden Untersuchungen, vor allem hinsichtlich des Vorhandenseins von Metabolitensubstanz, mit Hilfe dieser Methode durchgeführt. Das Erhitzen führt bei den untersuchten Benzilsäurederivaten zu grauen oder bläulichen Banden, die aber wesentlich beständiger als die Färbungen direkt nach Ansprühen sind. Zur Orientierung wurden durch Verdünnungsreihen die Mengen an Substanz von **1** - **4** bestimmt, die bei dieser Detektion visuell bestimmbar sind (Tab. 2).

Tab. 2: Detektierbare Substanzmenge [µg] der Ausgangsverbindungen

Detektion	Verbindung			
	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>
UV (254 nm)	0,2	0,4	0,8	1,0
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (in der Kälte)	3	1	0,2	0,2
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (Heizplatte)	2	0,4	0,2	0,2

N-Methyl-4-piperidinylderivate zeigen eine größere Empfindlichkeit bei der Detektion im UV als bei der Detektion mit Schwefelsäure. Bei den N-Methyl-3-piperidinylen verhält es sich entgegengesetzt.

Die Eignung von MBTH (BESTHORN'S-Reagenz) zum Nachweis von phenolischen Produkten und auch deren Substitutionstelle wurde von FRÖHLICH [8] für Benzophenone eingeführt und auf Benzilate ausgedehnt. Hiermit können im Gegensatz zu EMERSON Reagenz auch *p*-substituierte Phenole nachgewiesen werden [27, 28]. Die phenolischen Metabolite von **1**, **2**, **3** und **4** reagieren bis auf zwei Ausnahmen mit einer roten Farbe. Es handelt sich dabei sowohl um in 3- als auch 4-Position hydroxylierte Aromaten, so dass eine Abhängigkeit der Färbung von der Substitutionstelle, ähnlich wie bei einfachen monohydroxylierten Benzophenonen und Benzilsäurederivaten [8], nicht bestätigt werden kann. Vermutlich beruhen die verschiedenen Färbungen bei

einfacheren Phenolen auf unterschiedlichen Kupplungsmöglichkeiten, die hier wegen komplexerer Strukturen sterisch nicht möglich sind. Dies könnte auch die beiden Ausnahmen bei diesen Untersuchungen erklären, die mit einer blauen Farbe reagieren. Bei den Verbindungen (**21** und **53**) handelt es sich um Benzophenone, deren Aromaten im Verhältnis zu den gleichartig substituierten Benzilaten sterisch angreifbarer liegen und so zu weiteren Kupplungsmöglichkeiten führen können.

Insgesamt genügte der Einsatz von drei Fließmittelgemischen. Fließmittel I und II eignen sich besonders für die Trennung der basischen, Fließmittel II und III für die sauren Metabolitenfraktionen. Die Benzilsäuren zeigen stets kleinere  $R_F$ -Werte als die entsprechenden Piperidylbenzilate. Ester des N-Methyl-3-piperidinols weisen höhere  $R_F$ -Werte auf als ihre isomeren N-Methyl-4-piperidinylderivate.

Bei Vergleich der Metabolite mit Referenzsubstanzen wurden generell Mischchromatogramme erstellt.

Alle mengenorientierten Rückschlüsse sind in Verbindung mit der HPLC getroffen worden und stellen grobe Schätzungen dar (vgl. 3.3.2).

### **3.3.2 HPLC- und UV-Untersuchungen**

(vgl. 5.4.2.1)

Die HPLC wurde zur Charakterisierung der Metabolitenfraktionen und der isolierten Metabolite genutzt. Es wurde auf zwei von SMOLINKA entwickelte Methoden zur Trennung der Reaktionsprodukte bei der biomimetischen Umsetzung der Substanzen **1**, **2** und **3** zurückgegriffen [4]. Bei den Metabolitenextrakten wird eine Basislinientrennung nicht erreicht. Da dies keine Rolle bei der Charakterisierung der isolierten Metaboliten spielt, ist auf eine Optimierung der Bedingungen verzichtet worden. So bleibt die direkte Vergleichbarkeit mit den Ergebnissen der biomimetischen Umsetzungen erhalten.

Durch den Einsatz des DAD können Benzilsäure- und Benzophenonderivate anhand des UV-Spektrums unterschieden werden.

Die Aussagen zu den Mengenverhältnissen stellen aufgrund verschiedener Extinktionskoeffizienten nur grobe Schätzungen dar, die in Verbindung mit der DC durch Vergleich der Fleckengröße und -intensität abgeleitet werden. Sie sind nur als Näherungen anzusehen und spiegeln lediglich Tendenzen der Mengenverhältnisse

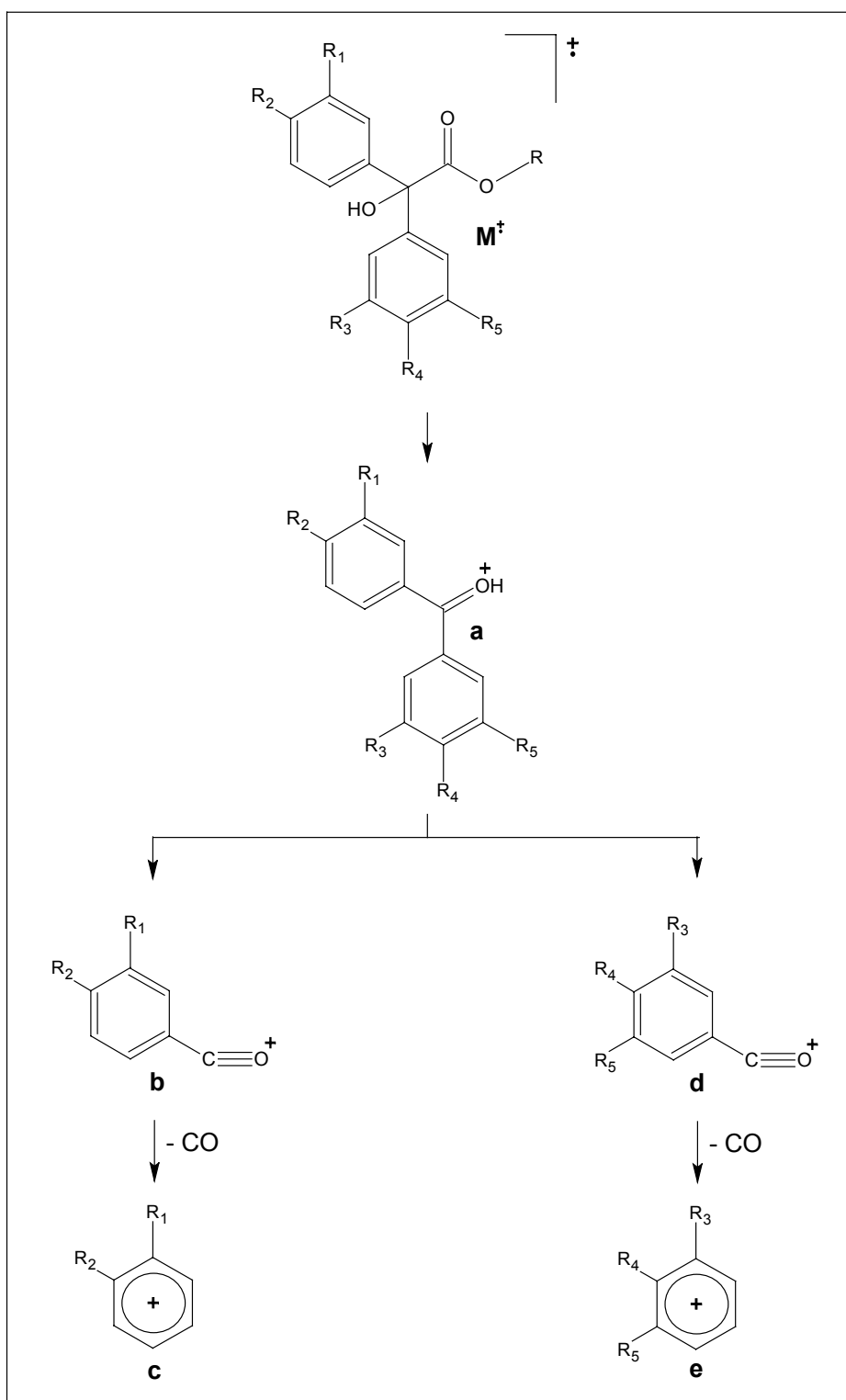


wider.

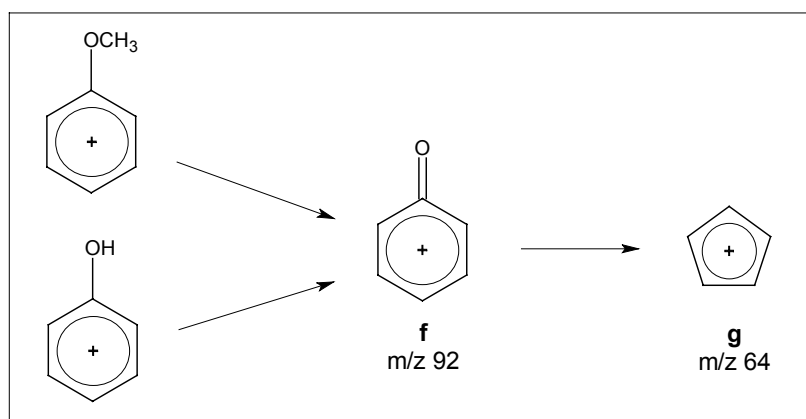
Beim Vergleich der Metabolite mit Referenzsubstanzen wurden generell Mischchromatogramme aufgenommen.

### 3.3.3 MS-Untersuchungen

Die wichtigste Methode zur Strukturaufklärung stellte bei den Metabolismusstudien die MS dar. Dabei erfolgt die Strukturzuordnung anhand des typischen Fragmentierungsmusters der Benzilsäurederivate. Dieser Zerfall lässt Rückschlüsse auf das Substitutionsmuster der Ursprungsverbindung zu und wurde von PETERSEN et al. für aromatisch unsubstituierte Benzilate bewiesen [29]. Das allgemeine Fragmentierungsverhalten, übertragen auf das mögliche Substitutionsmuster der Metabolite der Verbindungen **1** - **4**, ist in Schema 5 dargestellt. Durch  $\alpha$ -Spaltung fragmentiert das Molekülradikalkation unter Austritt von Kohlendioxid und dem Rest R zu einem stabilen Benzophenonkation **a**. Dieses wird auch als Schlüsselfragment angesehen. Es zerfällt weiter in die Benzoylkationen **b** und **d**, welche durch Decarbonylierung in die entsprechenden Phenylkationen **c** und **e** übergehen. Handelt es sich bei diesen Phenylkationen um monomethoxylierte Derivate, so kann sich unter Abspaltung eines Methylradikals das Fragment **f** mit  $m/z$  92 bilden (s. Schema 6) [30]. Dieses Bruchstück kann auch beim Zerfall monohydroxylierter Aromaten auftreten [30], spielt aber in den MS der Metabolite keine Rolle. Fragment **f** ist in der Lage, sich durch Austritt von Kohlenmonoxid zum Cyclopentadienylkation **g** zu stabilisieren. Letzteres scheint allerdings aufgrund sehr geringer Intensitäten in den MS der Metabolite von untergeordneter Bedeutung zu sein und wird bei der weiteren Auswertung nicht berücksichtigt.



Schema 5: Allgemeines Fragmentierungsmuster substituierter Benzilate  
 $R = H, CH_3$ , verschiedene Piperidylreste (vgl. Schema 7)  
 $R_1, R_2, R_3, R_4, R_5 = H, OH, OCH_3$

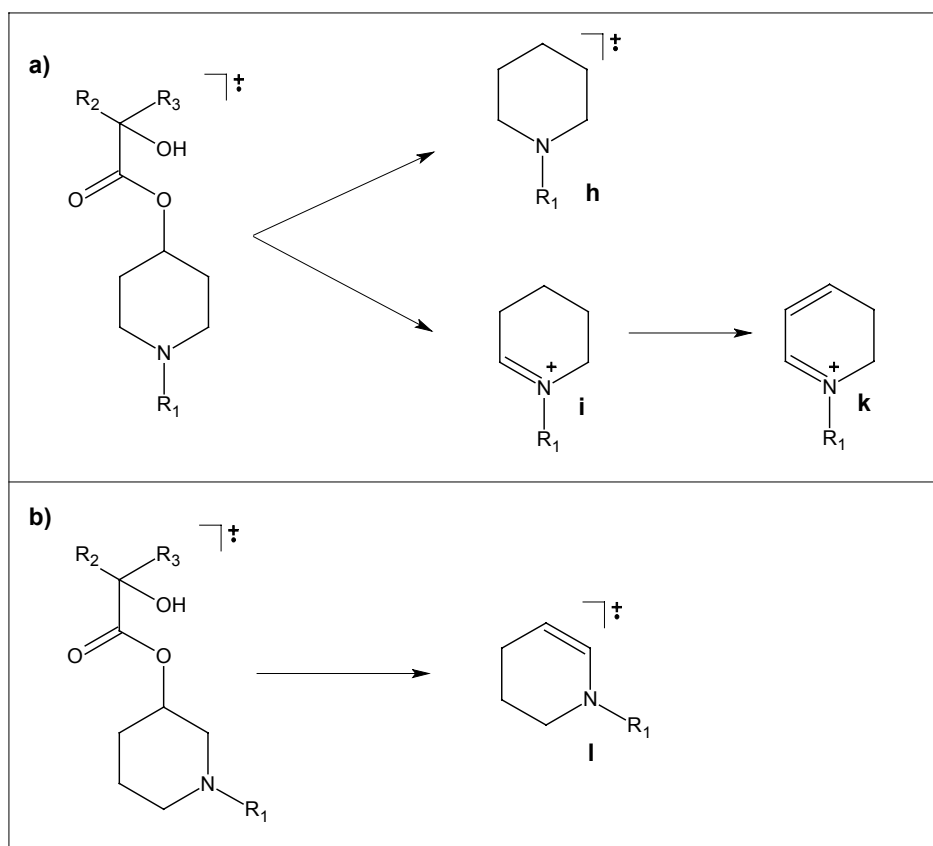


Schema 6: EI-MS-Fragmentierung von Monomethoxy- und -hydroxyphenylkationen

Die Piperidinole als alkoholische Komponenten der Estermetabolite unterliegen ebenfalls charakteristischen Fragmentierungsmustern [31]. Deuterierungsversuche haben gezeigt, dass durch Wanderung des Hydroxylwasserstoffes der Benzilsäure zur Bindungsstelle mit dem Piperidinring (hier C-4) und Aufspaltung der C-O-Einfachbindung neben Kohlendioxid und Benzophenon das Radikalkation **h** entsteht [32]. Alternativ bilden sich durch Bruch der Bindung am C-4 des Piperidinderivats neben dem Benzilsäureradikal Fragmentionen der Struktur **i**, die durch Abstraktion von Wasserstoff in die Dihydropyridylionen **k** übergehen können (vgl. Schema 7a) [29]. So entstehen beim Zerfall der N-Methyl-4-piperidinylderivate die Fragmentionen **h**, **i** und **k** in besonderem Maße, was sich an den Massen  $m/z$  96, 98 und 99 mit hohen relativen Intensitäten ausdrückt.

Im Gegensatz dazu dominiert bei den 3-Piperidylbenzylaten das Ion **l**, das auch häufig den Basispeak bildet. Es wird angenommen, dass unter Wanderung eines H-Atoms der C-2-Position des Piperidinols zum Carbonylsauerstoff Benzilsäure abgespalten wird. Unter Ausbildung der Doppelbindung entsteht das Radikalkation **l** (Schema 7b) [29]. Entsprechend wird für ein N-Methyl-3-piperidylbenzilat der Fragmenttyp **l** mit  $m/z$  97 in einer hohen relativen Intensität gebildet. Dies dient gleichzeitig der Unterscheidung zu N-Methyl-4-piperidylisomeren, bei denen Fragmentionen mit  $m/z$  97 in sehr geringer relativer Intensität auftreten.

Eine N-Dealkylierung des basischen Restes kann an der Verringerung der Fragmentionenmassen um 14 ME entsprechend den Zerfallsschemata erkannt und zugeordnet werden.



Schema 7: Fragmentierung der Piperidylreste im EI-Massenspektrometer ( $R_1 = H, CH_3$ ;  $R_2, R_3 = \text{Aryl}$ )

Molekülionenpeaks basischer Benzilsäureester erscheinen oft mit einer geringen relativen Intensität, teilweise fehlen sie völlig. N-Methyl-3-piperidinyll benzilate weisen dabei größere Instabilität der Molekülionen auf als die N-Methyl-4-piperidinyllisomere. Die Strukturaufklärung solcher Verbindungen erfolgte anhand der typischen Fragmentationen. Im Gegensatz dazu bilden die Benzophenone stabile Molekülionenpeaks. Isolierte Metabolite, die trotz Reinigung starke Verunreinigungen aufwiesen bzw. noch ein Metabolitengemisch darstellten, wurden einer GC-MS unterzogen.

### 3.4 Metabolisierung von (R,S)-N-Methyl-4-piperidyl 3,4-dimethoxybenzilat (1)

Insgesamt konnten neben der Ausgangssubstanz 20 Metabolite isoliert und identifiziert werden. Diese wurden unter Einbeziehung von Vergleichssubstanzen analytisch untersucht. Mit Hilfe von DC- und HPLC-Mischchromatogrammen konnten folgende Verbindungen identifiziert werden:

- die Ausgangsverbindung 1
- (R,S)-N-Methyl-4-piperidyl 4-hydroxy-3-methoxybenzilat (5)
- (R,S)-4-Piperidyl 3,4-dimethoxybenzilat (8)
- N-Oxid von 1 (12)
- (R,S)-3,4-Dimethoxybenzilsäure (16)
- 3,4-Dimethoxybenzophenon (20)
- 4-Hydroxy-3-methoxybenzophenon (21)

Die als Vergleichssubstanzen weiterhin herangezogenen Verbindungen (R,S)-N-Methyl-4-piperidyl 3,4-dihydroxybenzilat, (R,S)-Methyl 3,4-dimethoxybenzilat (35), 2-(3,4-Dimethoxyphenyl)-2-phenylethylsäure, 3-Hydroxy-4-methoxybenzophenon, 3,4-Dihydroxybenzophenon, 3,4-Dimethoxybenzoesäure, Vanillin- und Isovanillinsäure, N-Methyl-4-piperidinol und 4-Piperidinol, die potentielle Metaboliten darstellen, konnten nicht nachgewiesen werden.

#### 3.4.1 Analytische Charakterisierung der Metabolite

##### 3.4.1.1 DC-Untersuchungen

(vgl. 3.3.1)

Eine von der Stellung der phenolischen Gruppe substitutionsabhängige Färbung mit MBTH (Detektionsmittel D) wird bei den Benzophenonen gefunden. So ist das 4-Hydroxy-3-methoxybenzophenon (21) mit einer blaugrünen Fleckenfarbe gekennzeichnet. Im Gegensatz dazu reagiert 3-Hydroxy-4-methoxybenzophenon dunkelrot. Diese Verbindung konnte jedoch nicht als Metabolit nachgewiesen werden.

Die Reaktion mit EMERSON-Reagenz bleibt negativ, so dass das Substitutionsmuster bei phenolischen Metaboliten auf eine *p*-Hydroxygruppe hindeutet.

Tab. 3 zeigt die Retentionsfaktoren und die Detektion der isolierten Metabolite.

Tab. 3: DC, HPLC und UV-Maxima von (R,S)-N-Methyl-4-piperidyl 3,4-dimethoxybenzilat (**1**) und Metaboliten

Metabolit	DC					HPLC R <sub>T</sub> [min]	UV- Maxima [nm]
	R <sub>F</sub> -Wert Fließmittel <sup>1)</sup>		Detektion <sup>1)</sup>				
	I	II	B <sup>2)</sup>	C	D		
<u>1</u>	0,46	0,85	RT-braun H-hellblau	orange		10,7	278
<u>5</u>	0,44	0,75	RT-braun H-hellblau	orange	dunkelrot	6,5	281
<u>6</u>	0,42	0,70	RT-violett H-blau	orange	dunkelrot	5,0	278
<u>7</u>	0,26	0,57	RT-violett H-hellgrau	orange	dunkelrot	3,4	281
<u>8</u>	0,41	0,66	RT-braun H-hellblau	orange		10,0	278
<u>9</u>	0,22	0,56	RT-braun H-hellblau	orange	dunkelrot	6,0	281
<u>10</u>	0,15	0,45	RT-violett H-hellgrau	orange	dunkelrot	4,7	278
<u>11</u>	0,27	0,13	RT-violett H-hellgrau	n.d. <sup>3)</sup>	n.d. <sup>3)</sup>	keine Zuordnung	
<u>12</u> beide Isomere	0,20/ 0,36	0,25/ 0,36	RT-braun H-hellblau	orange		12,1/11,7	278
<u>13</u>	0,50	0,80	RT-braun H-hellblau	orange		7,1	278
<u>14</u>	0,44	0,68	RT-blau H-hellgrau	orange	dunkelrot	4,0	279
<u>15</u>	0,33	0,41	RT-blau H-hellgrau	orange	dunkelrot	3,1	281

<sup>1)</sup> vgl. 5.4.1.1;

<sup>2)</sup> RT = Raumtemperatur, H = Heizplatte (120 °C);

<sup>3)</sup> n.d. - nicht detektiert

Fortsetzung Tab. 3: DC, HPLC und UV-Maxima von (R,S)-N-Methyl-4-piperidyl 3,4-dimethoxybenzilat (**1**) und Metaboliten

Metabolit	DC					HPLC R <sub>T</sub> [min]	UV- Maxima [nm]
	R <sub>F</sub> -Wert Fließmittel <sup>1)</sup>			Detektion <sup>1)</sup>			
	I	II	III	B <sup>2)</sup>	D		
<b><u>16</u></b>	0,22	0,20	0,32	RT-braun H-hellblau		9,5	278
<b><u>17</u></b>	0,10	0,18	0,25	RT-braun H-hellblau	dunkelrot	6,1	281
<b><u>18</u></b>	0,11	0,09	0,14	RT-violett H-hellgrau	dunkelrot	5,5	278
<b><u>19</u></b>	0,04	0,06	0,07	RT-violett H-hellgrau	dunkelrot	4,2	281
<b><u>20</u></b>	0,75	0,90	0,95	gelb		16,2	237, 282, 314
<b><u>21</u></b>	0,55	0,47	0,42	gelb	blau	14,4	240, 285, 315
<b><u>22</u></b>	0,42	0,61	0,68	gelb	dunkelrot	13,4	233, 282, 314
<b><u>23</u></b>	0,25	0,25	0,28	gelb	dunkelrot	13,1	235, 285, 317
<b><u>24</u></b>	0,31	0,30	0,29	gelb	dunkelrot	keine Zuordnung	

<sup>1)</sup> vgl. 5.4.1.1;

<sup>2)</sup> RT = Raumtemperatur, H = Heizplatte (120 °C)

### 3.4.1.2 HPLC- und UV-Untersuchungen

(vgl. 3.3.2)

In Abb. 10 a) ist das Chromatogramm dargestellt, das die aus Urin gewonnenen unkonjugierten Metabolite nach Reinigung über Extrelut<sup>®</sup> zeigt. Hier erfolgte keine Trennung in eine saure und basische Fraktion. Im Gegensatz dazu ist in Abb. 10 b) das Chromatogramm der Fraktion der basischen unkonjugierten Metabolite dargestellt.

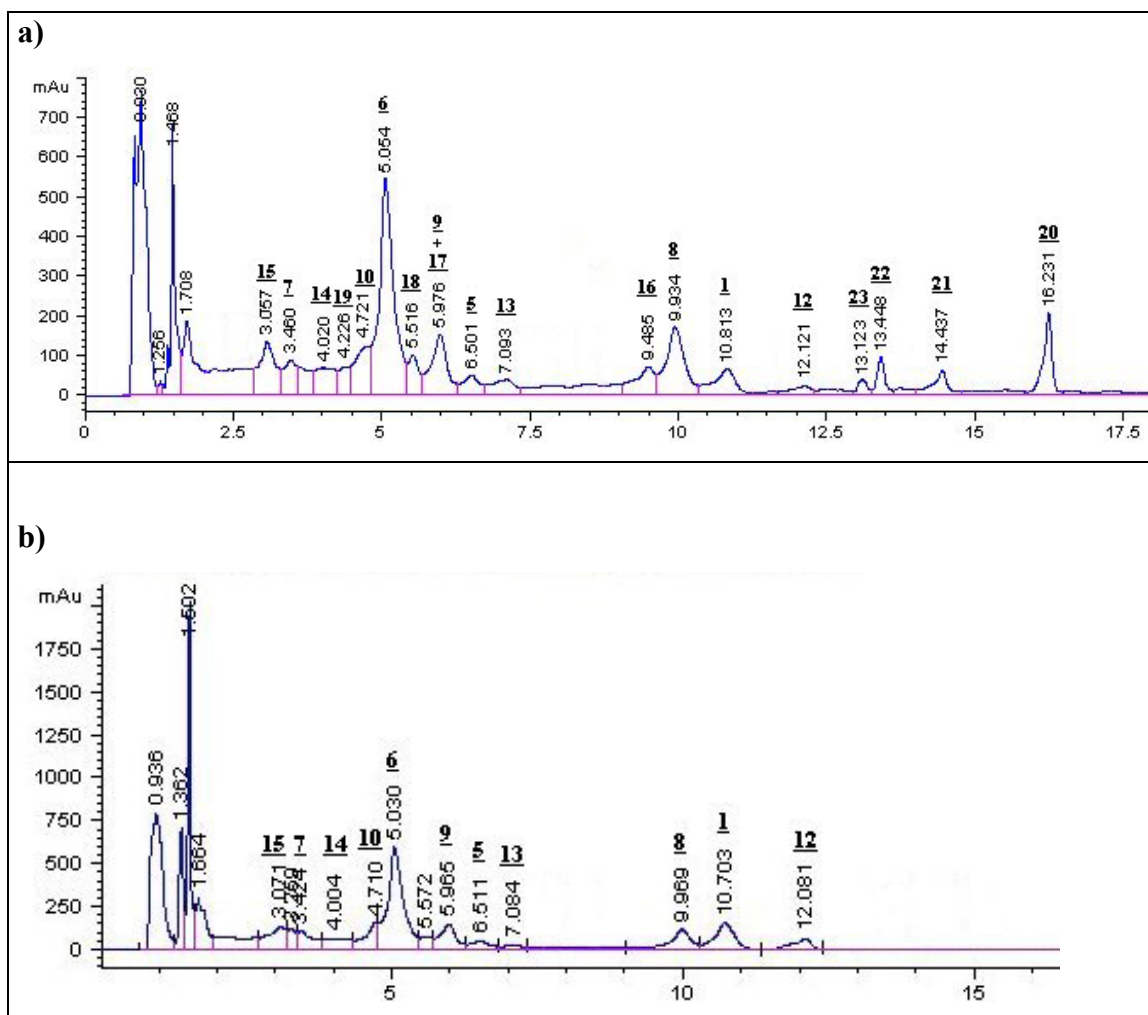


Abb. 10: HPLC-Chromatogramme verschiedener Metabolitenextrakte von **1**  
a) Unkonjugierte Metabolite des Urinextraktes  
b) Unkonjugierte Metabolite der basischen Urinextraktfraktion

Als Hauptmetabolit wird, in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der DC, **6** bestimmt. Auch die N-Dealkylierung scheint ein Hauptabbauweg zu sein, so wird u. a. Verbindung **8** in relativ großem Maße gebildet. Die Benzilsäuren gehören nicht zu den Hauptmetaboliten, aber das starke Auftreten der Benzophenone (Verbindungen **20** – **23**), als die weiteren Biotransformationsprodukte, deutet auf eine hohe Rate von Esterspaltungen bei der Metabolisierung hin.

Im UV-Spektrum führt eine Spaltung einer Methoxygruppierung zum Phenol zu einer bathochromen Verschiebung des UV-Maximums.

In Tab. 3 sind die Retentionszeiten und die UV-Absorptionsmaxima der Metabolite von **1** aufgeführt.



### 3.4.1.3 MS-Untersuchungen

(vgl. 3.3.3)

Tab. 4 zeigt die  $M^+$  und Massenfragmente der isolierten Metabolite.

Tab. 4: EI-MS-Fragmente von **1** und Metaboliten; in ( ) relativen Intensitäten

Metabolit	$M^+$	Fragmenttyp <sup>1)</sup>									
		a	b	c	d	e	h	i	k		
<b>1</b>	385 (1)	243 (27)	165 (4)	137 (1)	105 (100)	77 (23)	99 (42)	98 (21)	96 (13)		
<b>5</b>	371 (2)	229 (35)	151 (8)	123 (5)	105 (100)	77 (28)	99 (54)	98 (39)	96 (30)		
<b>6</b>	401 (1)	259 (34)	165 (9)	137 (3)	121 (100)	93 (13)	99 (39)	98 (38)	96 (75)		
<b>7</b>	387 (3)	245 (47)	151 (8)	123 (4)	121 (100)	93 (11)	99 (40)	98 (51)	96 (61)		
<b>8</b>	371 (1)	243 (23)	165 (10)	137 (2)	105 (100)	77 (24)	85 (20)	84 (13)	82 (8)		
<b>9</b>	357 (<1)	229 (12)	151 (10)	123(5)	105 (83)	77 (30)	85 (23)	84 (15)	82 (18)		
<b>10</b>	387 (<1)	259 (29)	165 (19)	137 (9)	121 (87)	93 (15)	85 (41)	84 (28)	82 (25)		
<b>11<sup>2)</sup></b>	kein $M^+$ = 373	245 (7)	151(5)	123 (2)	121 (10)	93 (4)	85 (10)	84 (7)	82 (5)		
<b>12</b> (Isomer I)	kein $M^+$ = 401 $M^+$ -O = 385 (1)	243 (28)	165 (16)	137 (6)	105 (89)	77 (24)	99 (32)	98 (16)	96 (16)		
<b>12</b> (Isomer II)	kein $M^+$ = 401 $M^+$ -O = 385 (1)	243 (38)	165 (12)	137 (3)	105 (100)	77 (25)	99 (16)	98 (11)	96 (10)		

<sup>1)</sup> vgl. 3.3.3; <sup>2)</sup> geringe Menge

Fortsetzung Tab 4: EI-MS-Fragmente von **1** und Metaboliten; in ( ) relativer Intensität

Metabolit	M <sup>+</sup>	Fragmenttyp <sup>1)</sup>							
		a	b	c	d	e	h	i	k
<b>13</b>	399 (2)	243 (37)	165 (18)	137 (11)	105 (80)	77 (25)	Fragment <b>m</b> <sup>2)</sup> 113 (20)		
<b>14</b> <sup>3)</sup>	431 (<<1)	289 (6)	165 (9)	137 (3)	151 (8)	123 (6)	99 (17)	98 (16)	96 (16)
<b>15</b>	417 (2)	275 (31)	151 (100)	123 (15)			99 (44)	98 (31)	96 (25)
<b>16</b>	288 (<<1)	243 (20)	165 (39)	137 (10)	105 (88)	77 (55)			
<b>17</b>	kein M <sup>+</sup> = 274	229 (4)	151 (11)	123 (3)	105 (100)	77 (71)			
<b>18</b>	nicht rein isolierbar und sehr geringe Substanzmenge								
<b>19</b>	kein M <sup>+</sup> = 290	245 (3)	151 (8)	123 (4)	121 (21)	93 (8)			
<b>20</b>	242 (29)		165 (100)	137 (13)	105 (31)	77 (55)			
<b>21</b>	228 (26)		151 (100)	123 (16)	105 (27)	77 (42)			
<b>22</b>	258 (34)		165 (96)	137 (15)	121 (48)	93 (22)			
<b>23</b>	244 (5)		151 (17)	123 (13)	121 (18)	93 (10)			
<b>24</b>	nicht rein isolierbar und sehr geringe Substanzmenge								

<sup>1)</sup> vgl. 3.3.3; <sup>2)</sup> vgl. 3.9.2; <sup>3)</sup> geringe Menge

Bei den Benzilsäurederivaten stellen die Benzoylkationen **d** häufig die Basispeaks bzw. besitzen eine große relative Intensität in Abhängigkeit von der Metabolitenreinheit bzw. -konzentration. Bei den Benzophenonen dagegen scheint der Basispeak vom Benzoylkation **b** gebildet zu werden.

Das N-Oxid **12** zeigt keinen Molekülionenpeak. Allgemein erscheint stattdessen ein Peak mit einer Differenz von 16 ME aufgrund des Verlustes des Sauerstoffes [33]. Die weitere Fragmentierung entspricht der von **1**.

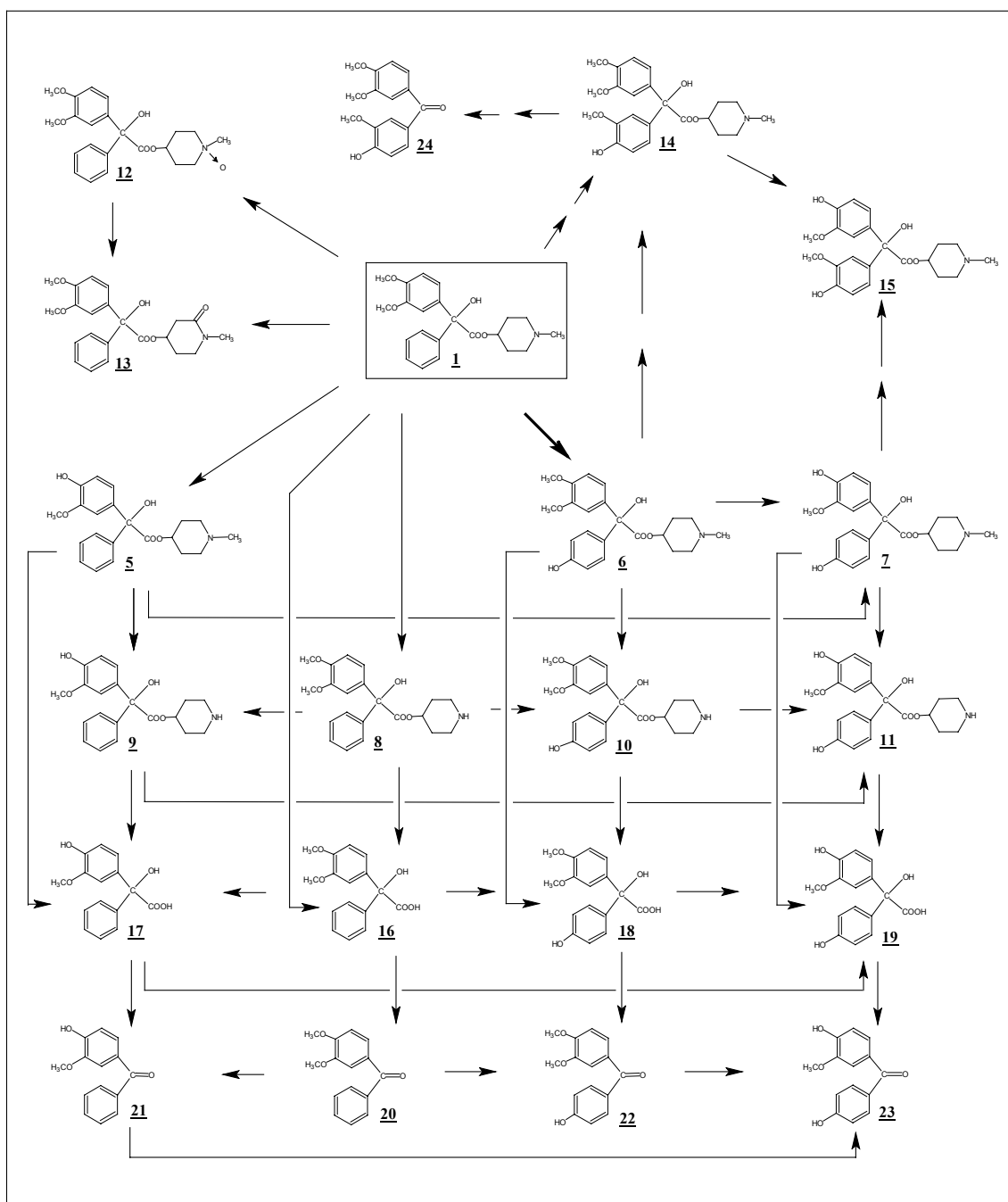
### 3.4.2 Identifizierung der Metabolite

Das anhand der besprochenen analytischen Methoden identifizierte Metabolitenspektrum von **1** im Urin der Ratte ist in Schema 8 dargestellt.

Alle Ester wurden aus den basischen Metabolitenfraktionen isoliert.

Der Ausgangsstoff **1** ist in relativ großer Menge (vgl. Abb. 10) wiedergefunden worden. Der Nachweis der *p*-Position der Hydroxygruppe bei 3,4-Hydroxy-Methoxy-Verbindungen gelingt indirekt durch das alleinige Vorhandensein von 4-Hydroxy-3-methoxybenzophenon (**21**) als Metabolit. 3-Hydroxy-4-methoxybenzophenon, das als Vergleichssubstanz ebenfalls vorliegt, konnte nicht nachgewiesen werden. Zur Unterscheidung der beiden Benzophenone ist die DC mit Fließmittel II und dem Detektionsmittel D (MBTH) durch unterschiedliche  $R_F$ -Werte und Anfärbbarkeit gut geeignet. Durch Nachweis der Übereinstimmung von **5** mit der Vergleichssubstanz (R,S)-N-Methyl-4-piperidyl 4-hydroxy-3-methoxybenzilat wird diese Annahme zusätzlich bestätigt. Die Reaktion der Hydroxy-Methoxy-Metabolite mit EMERSON-Reagenz bleibt negativ, was auf die Substitution der *p*-Stellung zur phenolischen Funktion hinweist. Für alle folgenden Verbindungen wird deshalb trotz Fehlens eines Vergleiches oder eines NMR-Spektrums eine Substitution von 4-Hydroxy-3-methoxy-angenommen: **7**, **9**, **11**, **14**, **15**, **17**, **19**, **23** und **24**.

Aufgrund der größten Peakfläche in der HPLC und der Fleckengröße und -intensität nach Ansprühen mit den verschiedenen Detektionsmitteln bei der DC wird Metabolit **6** als Hauptmetabolit angesehen. Durch die hohe Menge an isoliertem **6** erfolgte die Struktursicherung mit der NMR-Spektroskopie zusätzlich zur MS und insbesondere auch der Beweis der in *p*-Stellung abgelaufenen C-Oxygenierung am vorher



Schema 8: Metabolisierung von **1**

unsubstituierten Phenylring (vgl. Abb. 11 und Abb. 12)

Sowohl das  $^1\text{H}$ -NMR- als auch das  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von **6** und den zwei möglichen stellungsisomeren Phenolen (in *o*- oder *m*-Stellung) wurden im voraus berechnet. Diese  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren unterscheiden sich jedoch kaum voneinander. Da schon bei den Betrachtungen zu **1** große Diskrepanzen zwischen dem berechneten und dem gemessenen Spektrum, insbesondere bei den Signalen der aromatischen Protonen, auftreten, wurde auf einen weiteren Vergleich verzichtet. Das berechnete  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum dagegen zeigt gute Annäherungen an das gemessene Spektrum. In Tab. 5 sind die berechneten Werte des *o*- und *m*- Phenols im Vergleich zum berechneten und gemessenen Spektrums des in *p*-Stellung hydroxylierten Metaboliten **6** dargestellt.

Tab. 5: Vergleich des gemessenen  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrums von **6** mit den berechneten Spektren isomerer Phenole

C-Atom <sup>1</sup>	<b>6</b>		<i>o</i> -Phenol <sup>2</sup> ber.	<i>m</i> -Phenol <sup>3</sup> ber.	C-Atom <sup>1</sup>	<b>6</b>		<i>o</i> -Phenol <sup>2</sup> ber.	<i>m</i> -Phenol <sup>3</sup> ber.
	gem.	ber.				gem.	ber.		
1	134,4	130,4	125,2	130,9	12	128,9	123,5	128,7	109,5
2	110,8	110,8	111,3	110,8	13	80,4	79,6	76,7	79,6
3	148,7	151,2	151,2	151,2	14	174,3	173,4	173,2	173,4
4	148,3	148,5	148,5	148,5	15	75,0	74,2	74,2	74,2
5	110,3	114,3	114,3	114,3	16	30,1	29,3	29,3	29,3
6	119,9	117,9	118,4	117,9	17	52,1	52,7	52,7	52,7
7	133,7	134,1	123,8	135,6	18	45,8	46,1	46,1	46,1
8	128,9	123,5	127,8	112,7	19	52,1	52,7	52,7	52,7
9	115,0	116,0	120,6	129,4	20	30,1	29,3	29,3	29,3
10	156,3	157,3	153,3	158,9	21	55,9	56,0	56,0	56,0
11	115,0	116,0	118,0	115,6	22	55,9	56,0	56,0	56,0

gem. – gemessen; ber. – berechnet; <sup>1</sup> – Bezifferung vgl. Abb. 11, Abb. 12;

<sup>2</sup> - (R,S)-N-Methyl-4-piperidyl 2'-hydroxy-3,4-dimethoxybenzilat (Bezifferung C-10  $\equiv$  C2'-OH; C-12  $\equiv$  C4'); <sup>3</sup> - (R,S)-N-Methyl-4-piperidyl 3'-hydroxy-3,4-dimethoxybenzilat (Bezifferung C-10  $\equiv$  C3'-OH; C-11  $\equiv$  C4')

Die geringsten Abweichungen vom gemessenen  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum zeigt das berechnete Spektrum mit der *p*-Hydroxygruppe. Das entscheidende Indiz für die in *p*-Position stattgefundene C-Oxygenierung besteht in der Äquivalenz von C-8 und C-12 sowie C-9 und C-11 (vgl. auch Abb. 12).

Zum Vergleich – <sup>1</sup>H-NMR-Daten von **1**:  
 C-16, C-20 – 1,66 und 1,81; C-18 – 2,11; C-17, C-19 – 2,15 und 2,25; C-22 – 3,74; C-21 – 3,81; C-15 – 4,91; C-5 – 6,75; C-2, C-6 – 6,89 und 6,93; C-8, C-9, C-10, C-11, C-12 – 7,20 bis 7,37

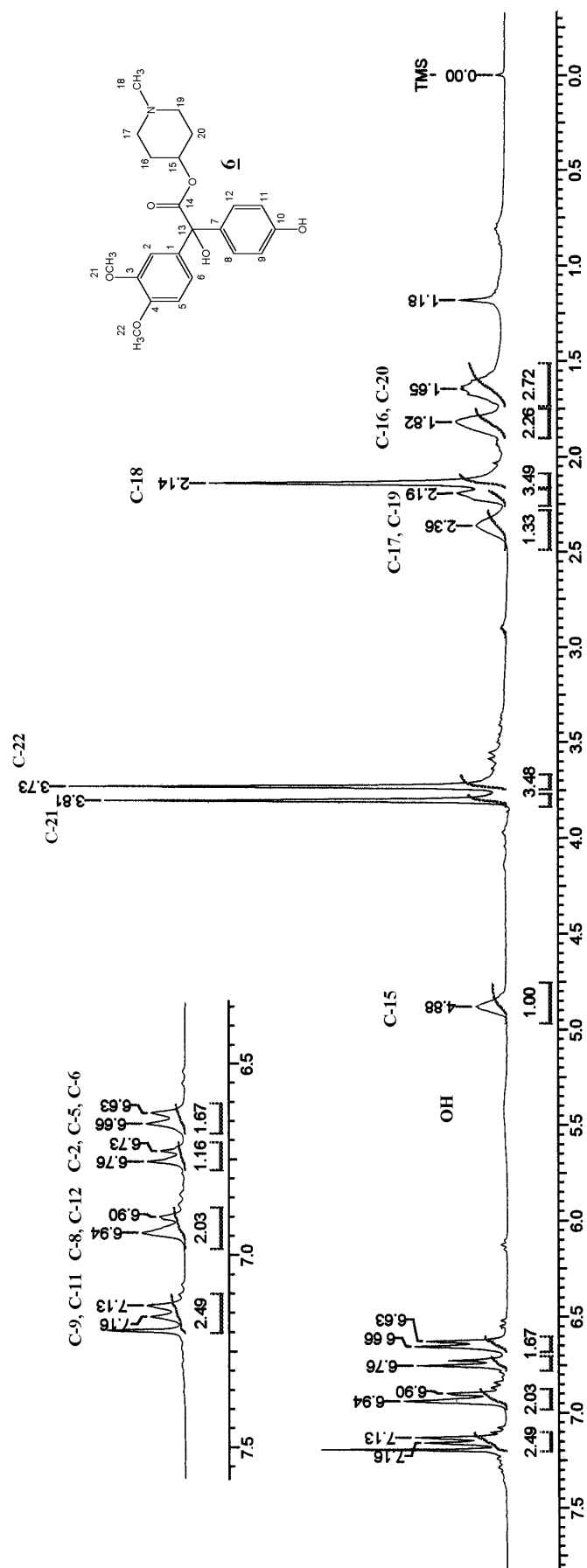


Abb. 11: <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum von **6**

Zum Vergleich –  $^{13}\text{C}$ -NMR-Daten von **1**:  
 C-16, C-20 – 30,4; C-18 – 46,1; C-17, C-19 – 52,1; C-21, C-22 – 55,8/55,9; C-15 – 84,5; C-13 – 80,7; C-5 – 110,2; C-2 – 110,7; C-6 – 119,9; C-9, C-11 – 127,4; C-8, C-12 – 127,9; C-10 – 128,0; C-7 – 134,4; C-1 – 142,2; C-4 – 148,5; C-3 – 148,7; C-14 – 174,0

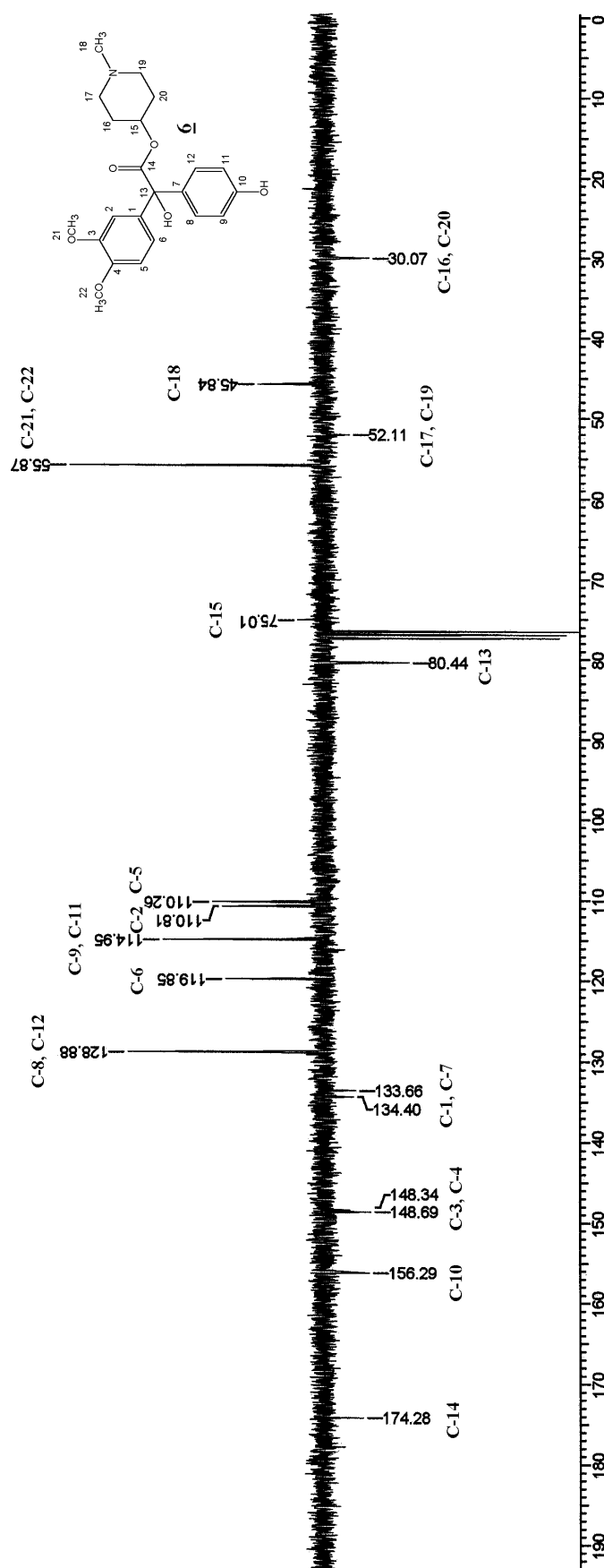


Abb. 12:  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von **6**

Im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum ist im aromatischen Bereich neben einer unsymmetrischen Aufspaltung (3,4-dimethoxy-substituierter Phenylring) eine symmetrische Duplett-aufspaltung mit Dacheffekt zu beobachten (Abb. 11), was durch die magnetische Äquivalenz von C-8 und C-12 sowie C-9 und C-11 erklärbar ist. Eine andere Substitution der phenolischen Gruppe würde zu unsymmetrischen Signalen führen.

Die zusätzliche phenolische Gruppe von **6** wirkt im Magnetfeld des  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrometers abschirmend. Die Signale der aromatischen Protonen sind gegenüber **1** hochfeldverschoben. Im  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrometer führt der Einfluss der Hydroxygruppe wie erwartet zu einer Hochfeldverschiebung der Signale der *o*-Kohlenstoffatome [34], bei den *m*-Atomen dagegen wenig ins Tieffeld. Aufgrund des Nachweises der in *p*-Stellung erfolgten C-Oxygenierung wird für die anderen hydroxylierten Metabolite dieses Substitutionsmuster ebenso angenommen.

Metabolit **7** kann mittels des MS mit  $\text{M}^+$  gut identifiziert werden. Durch seine beiden phenolischen Gruppen wird er in der HPLC relativ schnell eluiert.

Anhand der gegenüber N-methylierten Piperidinylbenzilaten um 14 ME verringerten Fragmente des Piperidinringes konnten die Metabolite **8**, **9**, **10** und **11** als N-De-methylierungsprodukte identifiziert werden. Mit Hilfe des Benzophenonkations als Schlüsselfragment und dessen Zerfallsprodukten erfolgte die Strukturzuordnung an den Phenylringen. Bei **8**, **9** und **10** können ebenfalls die Molekulationen zur Identifizierung herangezogen werden. **11** tritt in so geringer Konzentration auf, dass dieser Metabolit nicht mit der HPLC sondern nur über DC mit Sprühreagenz B detektiert werden konnte. Der Sauerstoff im N-Oxid **12** kann in zwei struktrurisomeren Formen axial oder äquatorial angeordnet vorliegen, wobei angenommen wird, dass der sperrige Benzilsäurerest bevorzugt die äquatoriale Stellung einnimmt (Abb. 13) [35]. Die *trans*-Isomere sind zumeist polarer als die *cis*-Isomere [36].

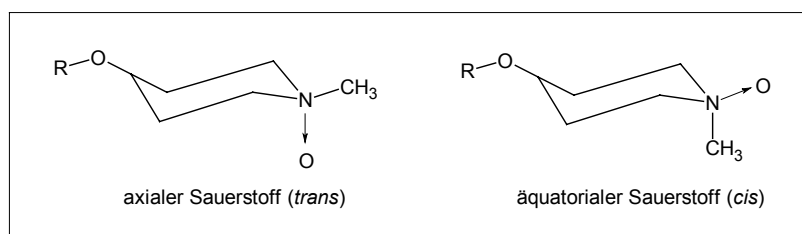


Abb. 13: Isomere Formen des N-Oxids; R – Benzilsäurerest

Beide N-Oxid-Isomere können mit DC und HPLC unter Verwendung von Vergleichssubstanzen nachgewiesen werden, wobei das *cis*-Isomer etwa mit dreifacher



Konzentration im Metabolitengemisch vorliegt.

Das MS von **13** weist einen Molekülpeak mit  $m/z$  399 auf. Das Benzophenonkation **a** besitzt die Fragmentmasse  $m/z$  243. Dies deutet auf eine zusätzliche Sauerstofffunktion am Piperidinring hin. Als mögliche Biotransformationsprodukte kommen dafür nur die N-Formylverbindung oder das Lactam von **1** in Frage (Abb. 14).

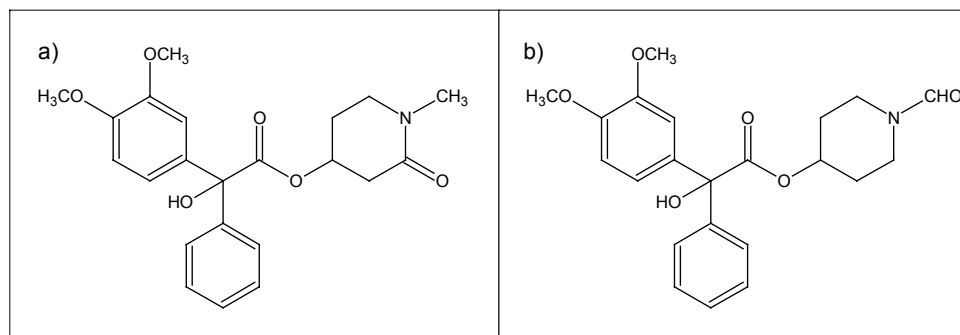


Abb. 14: Mögliche Strukturen von **13**

Mit Hilfe von Vergleichssubstanzen erfolgte die Identifizierung des Metaboliten als Lactam (s. 3.9).

In geringer Menge treten die Metaboliten **14** und **15** auf. Bei der Detektion mit konzentrierter Schwefelsäure als Sprühreagenz der DC zeigen die Metabolitenbanden eine typische blaue Färbung, die schnell verblasst.

In der sauren Fraktion der Metabolite sind vier Benzilsäuren (**16**, **17**, **18**, **19**) nachgewiesen worden. Es weist jedoch nur das MS von **16** einen Molekülpeak auf. Die anderen Säuren können anhand der weiteren Fragmente identifiziert werden. **17** tritt als Abbauprodukt bei Stabilitätsuntersuchungen auf und konnte unter Zuhilfenahme von in der Literatur beschriebenen analytischen Vergleichsdaten strukturaufgeklärt werden [37]. Der Nachweis von **18** gestaltete sich aufgrund ungenügender Reinheit des Metaboliten als problematisch. Nach vorsichtiger basischer Hydrolyse des Esters **6** wurde diese Benzilsäure gebildet und diente als Referenz für DC und HPLC. Eine vierfach substituierte Benzilsäure (analog **14** und **15**) ist nicht nachgewiesen worden.

Ebenfalls in den sauren Metabolitenfraktionen sind die fünf Benzophenone **20**, **21**, **22**, **23** und **24** identifiziert worden. Die Substanzbanden reagieren in der DC mit konzentrierter Schwefelsäure (Detektionsmittel **B**) in einer Gelbfärbung. Typisch bei den untersuchten Benzophenonen ist das stabile Auftreten des Molekülions, dass für Benzilsäurederivate sonst nicht zu erwarten ist. Metabolit **24** konnte aufgrund sehr geringer Konzentration nicht sofort identifiziert werden. Er wird jedoch bei der

Metabolisierung von 2 gebildet und diente als Referenz für DC und HPLC.

### 3.4.3 Phase-II-Metabolite

Nur ein geringer Teil der Metabolite wird in Form von Konjugaten ausgeschieden. Sie wurden nach Spaltung mit  $\beta$ -Glucuronidase/Arylsulfatase durch Vergleich mit den identifizierten authentischen Metaboliten über DC und HPLC bestimmt. Es konnten keine zusätzlichen Verbindungen detektiert werden.

Folgende Verbindungen wurden nachgewiesen:

- (R,S)-N-Methyl-4-piperidyl 4-hydroxy-3-methoxybenzilat (5)
- (R,S)-N-Methyl-4-piperidyl 4'-hydroxy-3,4-dimethoxybenzilat (6)
- (R,S)-N-Methyl-4-piperidyl 4,4'-dihydroxy-3-methoxybenzilat (7)
- (R,S)-4-Piperidyl 4,4'-dihydroxy-3-methoxybenzilat (11)
- (R,S)-4'-Hydroxy-3,4-dimethoxybenzilsäure (18)
- (R,S)-4,4'-Dihydroxy-3-methoxybenzilsäure (19)
- 4-Hydroxy-3-methoxybenzophenon (21)
- 4'-Hydroxy-3,4-dimethoxybenzophenon (22)
- 4,4'-Dihydroxy-3-methoxybenzophenon (23)

Es konnten nur phenolische Derivate bestimmt werden.

### 3.4.4 Kotmetabolite

Die Kotmetabolite wurden durch DC- und HPLC-Vergleich mit den identifizierten authentischen Harnmetaboliten ermittelt. Zusätzliche, noch nicht identifizierte, Metabolite wurden nicht nachgewiesen. Durch Vergleich der Flächen der Peaks in den HPLC-Chromatogrammen kann eingeschätzt werden, dass ca. ein Viertel der Menge an basischen Estern über den Kot ausgeschieden wird. In der sauren Metabolitenfraktion konnte nur eine geringe Menge an Benzophenonen gefunden werden. Benzilsäuren treten nicht auf.

Folgende Verbindungen wurden identifiziert:

- die Ausgangsverbindung 1
- (R,S)-N-Methyl-4-piperidyl 4-hydroxy-3-methoxybenzilat (5)
- (R,S)-N-Methyl-4-piperidyl 4'-hydroxy-3,4-dimethoxybenzilat (6)

- (R,S)-N-Methyl-4-piperidyl 4,4'-dihydroxy-3-methoxybenzilat (7)
- (R,S)-4-Piperidyl 4,4'-dihydroxy-3-methoxybenzilat (11)
- 3,4-Dimethoxybenzophenon (20)
- 4-Hydroxy-3-methoxybenzophenon (21)
- 4'-Hydroxy-3,4-dimethoxybenzophenon (22)
- 4,4'-Dihydroxy-3-methoxybenzophenon (23)

### **3.5 Metabolisierung von (R,S)-N-Methyl-3-piperidyl 3,4-dimethoxybenzilat (2)**

Insgesamt konnten neben der Ausgangssubstanz 19 Metabolite und vermutlich 3 Artefakte, entstanden durch die Aufarbeitung, isoliert und identifiziert werden. Diese wurden unter Einbeziehung von Vergleichssubstanzen analytisch untersucht. Mit Hilfe von DC- und HPLC-Mischchromatogrammen konnten folgende Verbindungen identifiziert werden:

- die Ausgangsverbindung 2
- (R,S)-3-Piperidyl 3,4-dimethoxybenzilat (28)
- (R,S)-3,4-Dimethoxybenzilsäure (16)
- 3,4-Dimethoxybenzophenon (20)
- 4-Hydroxy-3-methoxybenzophenon (21)
- (R,S)-Methyl 3,4-dimethoxybenzilat (35) (als Artefakt)

Die als Vergleichssubstanzen weiterhin herangezogenen Verbindungen (R,S)-N-Methyl-3-piperidyl 3,4-dimethoxybenzilat N-oxid, 2-(3,4-Dimethoxyphenyl)-2-phenylelessigsäure, 3-Hydroxy-4-methoxybenzophenon, 3,4-Dihydroxybenzophenon, 3,4-Dimethoxybenzoesäure, Vanillin- und Isovanillinsäure, N-Methyl-3-piperidinol und 3-Piperidinol, die potentielle Metaboliten darstellen, konnten nicht nachgewiesen werden.

#### **3.5.1 Analytische Charakterisierung der Metabolite**

##### **3.5.1.1 DC-Untersuchungen**

(vgl. 3.3.1)

Die Reaktion mit EMERSON Reagenz fiel bei allen Metaboliten negativ aus. Dies deutet auf *p*-hydroxylierte Phenolmetabolite hin.

Tab. 6 zeigt die Retentionsfaktoren und die Detektion der isolierten Metabolite.

Tab. 6: DC, HPLC und UV-Maxima von (R,S)-N-Methyl-3-piperidyl 3,4-dimethoxybenzilat (**2**) und Metaboliten

Metabolit	DC					HPLC R <sub>T</sub> [min]	UV- Maxima [nm]
	R <sub>F</sub> -Wert Fließmittel <sup>1)</sup>		Detektion <sup>1)</sup>				
	I	II	B <sup>2)</sup>	C	D		
<u>2</u>	0,76	0,92	RT-braun H-hellblau	orange		12,2	278
<u>25</u>	0,63	0,86	RT-braun H-hellblau	orange	dunkelrot	8,3	281
<u>26</u>	0,46	0,80	RT-violett H-blau	orange	dunkelrot	5,9	278
<u>27</u>	0,36	0,65	RT-violett H-hellgrau	orange	dunkelrot	4,8	281
<u>28</u>	0,56	0,62	RT-braun H-hellblau	orange		11,6	278
<u>29</u>	0,25	0,25	RT-braun H-hellgrau	n.d. <sup>3)</sup>	dunkelrot	keine Zuordnung	
<u>30</u>	0,34	0,59	RT-violett H-hellgrau	orange	dunkelrot	5,4	278
<u>31</u>	0,35	0,48	RT-violett H-hellgrau	n.d. <sup>3)</sup>	dunkelrot	4,4	281
<u>32</u>	0,58	0,78	RT-braun H-hellblau	orange		10,3	278
<u>33</u>	0,50	0,77	RT-blau H-hellgrau	n.d. <sup>3)</sup>	dunkelrot	6,7	281
<u>34</u>	0,49	0,70	RT-blau H-hellgrau	orange	dunkelrot	6,2	277

<sup>1)</sup> vgl. 5.4.1.1;

<sup>2)</sup> RT = Raumtemperatur, H = Heizplatte (120 °C);

<sup>3)</sup> n.d. - nicht detektiert

Fortsetzung Tab. 6: DC, HPLC und UV-Maxima von (R,S)-N-Methyl-3-piperidyl 3,4-dimethoxybenzilat (**2**) und Metaboliten

Metabolit	DC					HPLC R <sub>T</sub> [min]	UV- Maxima [nm]
	R <sub>F</sub> -Wert Fließmittel <sup>1)</sup>			Detektion <sup>1)</sup>			
	I	II	III	B <sup>2)</sup>	D		
<u>16</u>	0,22	0,20	0,32	RT-braun H-hellblau		9,5	278
<u>17</u>	0,10	0,18	0,25	RT-braun H-hellblau	dunkelrot	6,1	281
<u>18</u>	0,11	0,09	0,14	RT-violett H-hellgrau	dunkelrot	5,5	278
<u>19</u>	0,04	0,06	0,07	RT-violett H-hellgrau	dunkelrot	4,2	281
<u>20</u>	0,75	0,90	0,95	gelb		16,2	237, 282, 314
<u>21</u>	0,55	0,47	0,42	gelb	blaugrün	14,4	240, 285, 315
<u>22</u>	0,42	0,61	0,68	gelb	dunkelrot	13,4	233, 282, 314
<u>23</u>	0,25	0,25	0,28	gelb	dunkelrot	13,1	235, 285, 317
<u>24</u>	0,31	0,30	0,29	gelb	dunkelrot	12,7	235, 286, 316
<u>35</u>	0,86	0,92		RT-braun H-hellblau		14,4	278
<u>36</u>	0,51	0,91		RT-braun H-hellblau	dunkelrot	12,1	281
<u>37</u>	0,48	0,84		RT-violett H-hellgrau	dunkelrot	7,8	278

<sup>1)</sup> vgl. 5.4.1.1;

<sup>2)</sup> RT = Raumtemperatur, H = Heizplatte (120 °C)

### 3.5.1.2 HPLC- und UV-Untersuchungen

(vgl. 3.3.2)

In Abb. 15 a) ist das Chromatogramm dargestellt, das die aus Urin gewonnenen Metabolite der sauren unkonjugierten Fraktion nach Reinigung über Extrelut® zeigt. Abb. 15 b) stellt dagegen die Metabolite der basischen unkonjugierten Urinfraktion dar.

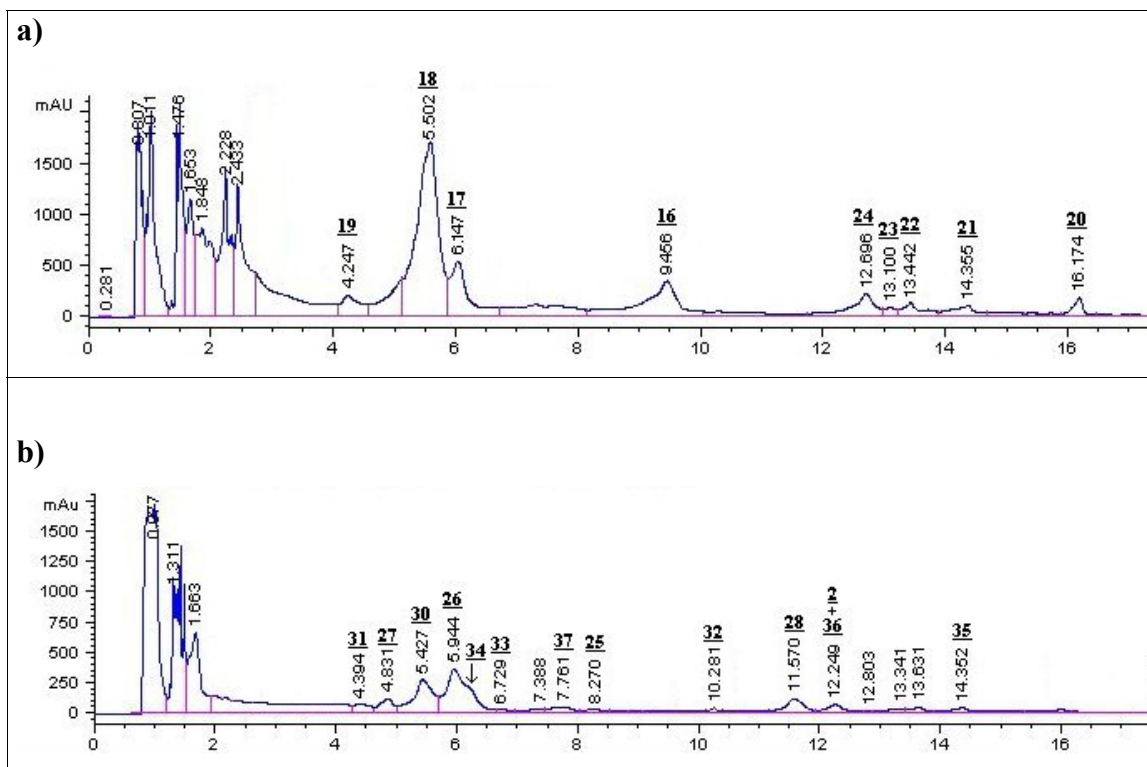


Abb. 15: HPLC-Chromatogramme verschiedener Metabolitenextrakte von **2**  
a) Unkonjugierte Metabolite der sauren Urinextraktfraktion  
b) Unkonjugierte Metabolite der basischen Urinextraktfraktion

In Übereinstimmung mit der Einschätzung der Fleckenintensität bei der DC können die hydroxylierten Metabolite **18** und **26** als Hauptmetabolite angesehen werden. **18** selbst ist dabei das Hydrolyseprodukt von **26**. Die Esterspaltung und damit die Bildung der verschieden substituierten Benzilsäuren stellt neben der aromatischen C-Oxygenierung den Hauptabbauweg dar. Auch die N-Dealkylierung, die u. a. zur Bildung von **30** führt, spielt eine bedeutende Rolle.

Die UV-Spektren der Metabolite mit Spaltung einer Methoxygruppierung zum Phenol zeigen bathochrome Verschiebungen der UV-Maxima.

In Tab. 6 sind die Retentionszeiten und die UV-Absorptionsmaxima der Metabolite von

2 aufgeführt.

### 3.5.1.3 MS-Untersuchungen

(vgl. 3.3.3)

Tab. 7 zeigt die  $M^+$  und Massenfragmente der isolierten Metabolite.

Die Basispeaks bzw. Fragmente mit der größten relativen Intensität, in Abhängigkeit von der Metabolitenreinheit und -konzentration, werden bei den Benzilaten von den Benzoylkationen **d** bzw. bei den Benzophenonen auch von **b** gebildet. Bei den basischen Estern kann ebenfalls das Radikalkationenfragment **l** den Basispeak stellen.



Tab. 7: EI-MS-Fragmente von **2** und Metaboliten; in ( ) relativer Intensität

Metabolit	M <sup>+</sup>	Fragmenttyp <sup>1)</sup>								
		a	b	c	d	e	h	i	l	k
<u>2</u>	385 (<1)	243 (8)	165 (7)	137 (2)	105 (87)	77 (25)	99 (42)	98 (21)	97 (100)	96 (12)
<u>25</u>	371 (<1)	229 (18)	151 (10)	123 (10)	105 (100)	77 (44)	99 (17)	98 (13)	97 (45)	96 (14)
<u>26</u>	401 (<1)	259 (10)	165 (11)	137 (3)	121 (83)	93 (10)	99 (29)	98 (25)	97 (100)	96 (14)
<u>27</u>	kein M <sup>+</sup> = 387	245 (6)	151 (6)	123 (15)	121 (21)	93 (18)	99 (11)	98 (14)	97(30)	96 (10)
<u>28</u>	371 (<1)	243 (45)	165 (17)	137 (9)	105 (30)	77 (20)	85 (24)	84 (32)	83 (44)	82 (21)
<u>29</u>	kein M <sup>+</sup> = 357	229 (15)	151 (47)	123 (19)	105 (48)	77 (48)	85 (22)	84 (23)	83 (27)	82 (13)
<u>30</u>	387 (<1)	259 (11)	165 (10)	137 (14)	121 (45)	93 (15)	85 (39)	84 (22)	83 (43)	82 (20)
<u>31<sup>2)</sup></u>	kein M <sup>+</sup> = 373	245 (4)	151 (9)	123 (13)	121 (29)	93 (13)	85 (25)	84 (24)	83(32)	82 (20)
<u>32</u>	399 (2)	243 (23)	165 (7)	137 (2)	105 (100)	77 (24)	Fragment <b>m</b> <sup>3)</sup> 113 (54)			
<u>33</u>	431 (1)	289 (11)	165 (37)	137 (6)	151 (62)	123 (13)	99 (45)	98 (30)	97 (100)	96 (16)
<u>34</u>	461 (1)	319 (8)	165 (19)	137 (8)	181 (13)	153 (4)	99 (22)	98 (17)	97 (36)	96 (15)

<sup>1)</sup> vgl. 3.3.3; <sup>2)</sup> geringe Menge; <sup>3)</sup> vgl. 3.9.2

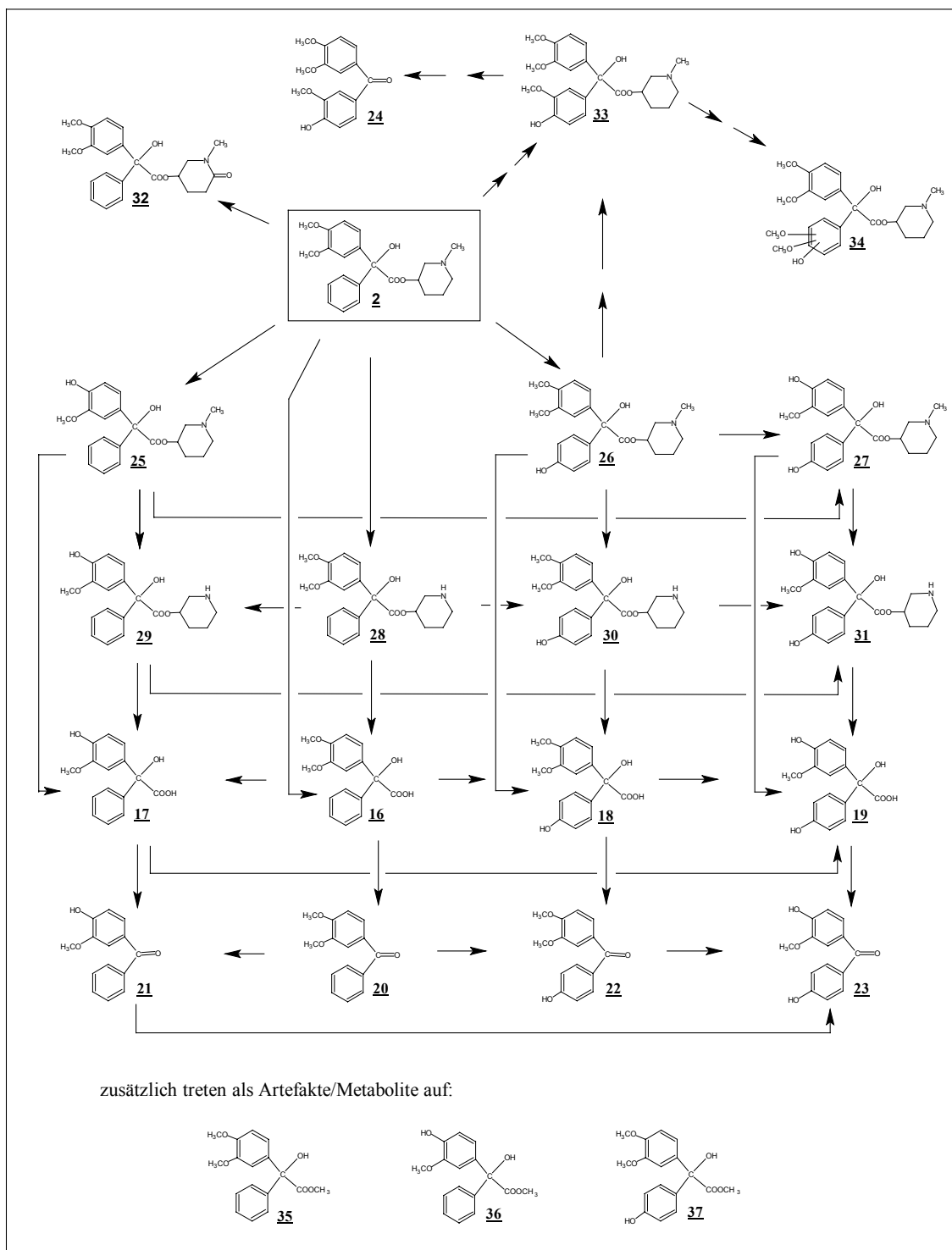
Fortsetzung Tab. 6: EI-MS-Fragmente von **2** und Metaboliten; in ( ) relativer Intensität

Metabolit	M <sup>+</sup>	Fragmenttyp <sup>1)</sup>				
		a	b	c	d	e
<b><u>16</u></b>	288 (2)	243 (15)	165 (47)	137 (11)	105 (57)	77 (54)
<b><u>17</u></b>	nicht rein isolierbar und sehr geringe Substanzmenge					
<b><u>18</u></b>	kein M <sup>+</sup> = 304	259 (3)	165 (7)	137 (9)	121 (15)	93 (9)
<b><u>19<sup>2)</sup></u></b>	kein M <sup>+</sup> = 290	245 (3)	151 (7)	123 (7)	121 (14)	93 (8)
<b><u>20</u></b>	242 (19)		165 (98)	137 (15)	105 (99)	77 (100)
<b><u>21</u></b>	228 (9)		151 (36)	123 (13)	105 (26)	77 (28)
<b><u>22</u></b>	258 (5)		165 (10)	137 (6)	121 (10)	93 (8)
<b><u>23</u></b>	nicht rein isolierbar und sehr geringe Substanzmenge					
<b><u>24</u></b>	288 (10)		165 (29)	137 (10)	151 (31)	123 (18)
<b><u>35</u></b>	302 (1)	243 (16)	165 (9)	137 (3)	105 (100)	77 (36)
<b><u>36</u></b>	288 (1)	229 (21)	151 (9)	123 (8)	105 (100)	77 (31)
<b><u>37</u></b>	318 (2)	259 (20)	165 (12)	137 (3)	121 (100)	93 (10)

<sup>1)</sup> vgl. 3.3.3; <sup>2)</sup> geringe Menge

### 3.5.2 Identifizierung der Metabolite

Das anhand der besprochenen analytischen Methoden identifizierte Metaboliten-spektrum von **2** im Urin der Ratte ist in Schema 9 dargestellt.



Schema 9: Metabolisierung von **2**

Die Ausgangssubstanz **2** ist eindeutig über die beschriebenen analytischen Methoden nachgewiesen worden.

Bei den Metaboliten **17**, **19**, **24**, **25**, **27**, **29**, **31** und **33** wird an den substituierten aromatischen Ringen die 4-Hydroxy-3-Methoxy-Substitution und nicht die isomere 3-Hydroxy-4-Methoxy-Form angenommen. Dafür spricht das alleinige Vorhandensein von 4-Hydroxy-3-methoxybenzophenon (**21**) als Metabolit, während das isomere 3-Hydroxy-4-methoxybenzophenon, das als Vergleichssubstanz ebenfalls vorlag, nicht nachgewiesen werden konnte. Die Reaktion der Hydroxy-Methoxy-Verbindungen mit EMERSON-Reagenz bleibt negativ, was ebenfalls auf die Substitution der *p*-Stellung zur phenolischen Funktion hinweist. **25** wurde als Abbauprodukt bei Stabilitätsuntersuchungen festgestellt. Die dabei erhaltenen analytischen Daten stimmen mit den hier ermittelten überein [37].

Aufgrund der in Kapitel 3.4.2 dargelegten Beweisführung wird eine in *p*-Position erfolgte Hydroxylierung am vorher unsubstituierten Phenylring bei den entsprechenden Metaboliten angenommen. Eine Bestätigung durch NMR war hier aufgrund unzureichender Substanzmengen nicht möglich.

Bei den Metaboliten **28**, **29**, **30** und **31** handelt es sich um N-demethylierte Produkte, wie aus den um 14 ME reduzierten Piperidinylfragmenten in der MS hervorgeht. Die Strukturzuordnung erfolgte mit Hilfe der Fragmentationen und z. T. anhand der Molekülionen.

**32** fällt aufgrund seines Molekülpeaks von  $m/z$  399 und des Benzophenonkations mit  $m/z$  243 im MS auf. Dies deutet, wie schon bei **13**, auf eine zusätzliche Sauerstofffunktion am Piperidinylrest, entweder als N-Formyl-Derivat oder als Lactam, hin. Mittels synthetisierter Vergleichssubstanz konnte der Metabolit als Lactam identifiziert werden (s. 3.9).

Mit **33** und **34** treten mehrfach am zuvor unsubstituierten Phenylring strukturveränderte Metabolite auf. Mit Hilfe der Molekülionen und Fragmentationen erfolgte die Strukturzuordnung an den aromatischen Ringen. Die genaue Substitution der Hydroxylgruppe bei **34** kann nur aufgrund der negativen Reaktion mit EMERSON-Reagenz bei der DC postuliert werden. Dies deutet auf eine Substitution in *p*-Stellung zur phenolischen Gruppe hin. Typisch ist die blaue Reaktion mit konzentrierter Schwefelsäure bei der DC-Detektion.

In der sauren Fraktion der Metabolite konnten die Benzilsäuren **16**, **17**, **18** und **19**

nachgewiesen werden. Ähnlich, wie schon bei der Metabolisierung von **1**, gibt nur **16** einen Molekülionenpeak, obwohl **18** als ein Hauptmetabolit anzusehen ist (vgl. 3.5.1.2). Dies ist auf eine wesentlich geringere Stabilität im EI-MS zurückzuführen. Die Benzilsäuren konnten anhand der Fragmentationen und mit Hilfe der authentischen Vergleichssubstanzen, die bei der Metabolisierung von **1** isoliert wurden, identifiziert werden.

In der sauren Metabolitenfraktion treten die Benzophenone **20**, **21**, **22**, **23** und **24** auf. Bis auf **23** zeigen alle ein stabiles Molekülion im MS und können zusätzlich durch DC-Vergleich mit den authentischen Benzophenonmetaboliten von **1** identifiziert werden.

Weiterhin treten neben den genannten Metaboliten auch die Methylester einiger Benzilsäuren auf (**35**, **36**, **37**). Sie stellen vermutlich Artefakte dar, entstanden während der Aufarbeitung durch Umesterung in Gegenwart von Methanol, da sie nur in der Fraktion der Basen auftreten, eigentlich aber als Biotransformationsprodukte in der ersten eluierten Fraktion der sauren und neutralen Metabolite hätten erscheinen müssen. Theoretisch können sie im Körper aus Benzilsäuren mit Hilfe von Methyltransferasen gebildet werden.

### **3.5.3 Phase-II-Metabolite**

Nur eine sehr geringe Metabolitenmenge konnte als Phase-II-Metabolite nach Konjugatsspaltung bestimmt werden. Die Strukturzuordnung erfolgte über die DC durch Vergleich mit den im Harn identifizierten authentischen Metaboliten. Zusätzliche, noch nicht identifizierte, Metabolite konnten im Extrakt nicht nachgewiesen werden. Die HPLC konnte keine eindeutigen Aussagen liefern. Es wurden weder Benzilsäure- noch Benzophenonderivate sondern nur 2 Konjugate von phenolischen N-dealkylierten basischen Estern gefunden.

Folgende Verbindungen sind nachgewiesen worden:

- (R,S)-3-Piperidyl 4'-hydroxy-3,4-dimethoxybenzilat (**30**)
- (R,S)-3-Piperidyl 4,4'-dihydroxy-3-methoxybenzilat (**31**)

### 3.5.4 Kotmetabolite

Die Kotmetabolite wurden durch DC- und HPLC-Vergleich mit den identifizierten Harnmetaboliten ermittelt. Zusätzliche, noch nicht identifizierte, Metabolite konnten nicht nachgewiesen werden. Durch Vergleich der Peakflächen in den HPLC-Chromatogrammen und der Fleckenintensität in der DC kann eingeschätzt werden, dass ca. ein Drittel der Menge an basischen Estern über den Kot ausgeschieden wird. Die Verbindungen **30** und **26** bilden die Kothauptmetaboliten. In der sauren Metabolitenfraktion treten keine Benzilsäuren und nur eine geringe Menge an Benzophenonen auf. Die Ausgangsverbindung **2** selbst wurde nicht gefunden.

Folgende Verbindungen wurden nachgewiesen:

- (R,S)-N-Methyl-3-piperidyl 4-hydroxy-3-dimethoxybenzilat (**25**)
- (R,S)-N-Methyl-3-piperidyl 4'-hydroxy-3,4-dimethoxybenzilat (**26**)
- (R,S)-N-Methyl-3-piperidyl 4,4'-dihydroxy-3-methoxybenzilat (**27**)
- (R,S)-3-Piperidyl 4'-hydroxy-3,4-dimethoxybenzilat (**30**)
- (R,S)-N-Methyl-3-piperidyl 4'-hydroxy-3, 3',4 -trimethoxybenzilat (**33**)
- 3,4-Dimethoxybenzophenon (**20**)
- 4-Hydroxy-3-methoxybenzophenon (**21**)
- 4'-Hydroxy-3,4-dimethoxybenzophenon (**22**)

### **3.6 Metabolisierung von N-Methyl-4-piperidyl 3,3'-dimethoxybenzilat (3)**

Insgesamt konnten neben der Ausgangssubstanz 19 Metabolite isoliert und identifiziert werden. Diese wurden unter Einbeziehung von Vergleichssubstanzen analytisch untersucht. Mit Hilfe von DC- und HPLC-Mischchromatogrammen konnten folgende Verbindungen identifiziert werden:

- die Ausgangsverbindung 3
- 4-Piperidyl 3,3'-dimethoxybenzilat (42)
- 3,3'-Dimethoxybenzilsäure (46)
- 3,3'-Dimethoxybenzophenon (51)

Die als Vergleichssubstanzen weiterhin herangezogenen Verbindungen N-Methyl-4-piperidyl 3,3'-dimethoxybenzilat N-oxid, Methyl 3,3'-dimethoxybenzilat (68), 3-Methoxybenzoesäure, N-Methyl-4-piperidinol und 4-Piperidinol, die potentielle Metaboliten darstellen, konnten nicht nachgewiesen werden.

#### **3.6.1 Analytische Charakterisierung der Metabolite**

##### **3.6.1.1 DC-Untersuchungen**

(vgl. 3.3.1)

Bei der Detektion mit Detektionsmittel D (MBTH) reagieren die phenolischen Metabolite mit roter Farbe. Eine Ausnahme stellt das Benzophenon 53 dar, das mit einer blauen Färbung reagiert.

Tab. 8 zeigt die Retentionsfaktoren und die Detektion der isolierten Metabolite.

Tab. 8: DC, HPLC und UV-Maxima von N-Methyl-4-piperidyl 3,3'-dimethoxybenzilat (**3**) und Metaboliten

Metabolit	DC						HPLC R <sub>T</sub> [min]	UV- Maxima [nm]
	R <sub>F</sub> -Wert Fließmittel <sup>1)</sup>			Detektion <sup>1)</sup>				
	I	II	III	B <sup>2)</sup>	C	D		
<u>3</u>	0,54	0,89	0,88	RT-grün H-grau	orange		13,6	276/282
<u>38</u>	0,43	0,69	0,79	RT-grün H-grau	orange	dunkelrot	10,7	277/283
<u>39</u>	0,40	0,64	0,78	RT-grün <sup>3)</sup> H-grau	orange	dunkelrot	10,2	277/283
<u>40</u>	0,31	0,45	0,54	RT-grün <sup>3)</sup> H-grau	orange	dunkelrot	7,7	281
<u>41</u>	0,26	0,47	0,58	RT-blaugrün H-blaugrau	orange	dunkelrot	8,1	277/283
<u>42</u>	0,21	0,26	0,38	RT-grün H-grau	orange		8,6	276/282
<u>43</u>	0,05	0,28	0,26	RT-grün <sup>3)</sup> H-grau	orange	dunkelrot	6,7	277/283
<u>44</u>	0,04	0,04	0,02	RT-grün H-grau	n.d. <sup>4)</sup>	dunkelrot	3,7	277/283
<u>45</u>	0,58	0,78	0,81	RT-grün H-grau	orange		8,5	276/282
<u>15</u>	0,33	0,41	0,49	RT-blau H-hellgrau	orange	dunkelrot	7,2	281

<sup>1)</sup> vgl. 5.4.1.1;

<sup>2)</sup> RT = Raumtemperatur, H = Heizplatte (120 °C);

<sup>3)</sup> grün - mit orangem Kern;

<sup>4)</sup> n.d. - nicht detektiert



Fortsetzung Tab. 8: DC, HPLC und UV-Maxima von N-Methyl-4-piperidyl 3,3'-dimethoxybenzilat (**3**) und Metaboliten

Metabolit	DC					HPLC R <sub>T</sub> [min]	UV- Maxima [nm]
	R <sub>F</sub> -Wert Fließmittel <sup>1)</sup>			Detektion <sup>1)</sup>			
	I	II	III	B <sup>2)</sup>	D		
<b><u>46</u></b>	0,23	0,28	0,36	RT-grün H-grau		3,4	276/282
<b><u>47</u></b>	0,15	0,23	0,22	RT-grün H-grau	dunkelrot	2,7	277/283
<b><u>48</u></b>	0,08	0,18	0,16	RT-grün H-grau	dunkelrot	2,0	277/283
<b><u>49</u></b>	0,02	0,10	0,08	RT-grün H-grau	dunkelrot	1,8	281
<b><u>50</u></b>	0,12	0,18	0,22	RT-grün H-grau	dunkelrot	1,5	277/283
<b><u>51</u></b>	0,91	0,94	0,90	gelb		11,3	221, 258, 311
<b><u>52</u></b>	0,56	0,88	0,86	gelb	dunkelrot	9,3	221, 258, 313
<b><u>53</u></b>	0,59	0,40	0,42	gelb	blau	8,6	237, 287, 317
<b><u>54</u></b>	0,40	0,39	0,39	gelb	dunkelrot	6,6	237, 287, 317
<b><u>55</u></b>	0,38	0,23	0,32	gelb	dunkelrot	7,1	219, 261, 313

<sup>1)</sup> vgl. 5.4.1.1;

<sup>2)</sup> RT = Raumtemperatur, H = Heizplatte (120 °C)

### 3.6.1.2 HPLC- und UV-Untersuchungen

(vgl. 3.3.2)

Abb. 16 a) zeigt das Chromatogramm der Metabolite der sauren unkonjugierten Urinfraction, Abb. 16 b) das der basischen unkonjugierten Urinfraction und Abb. 16 c) das der basischen Metabolitenfraction im Kot jeweils nach Reinigung über Extrelut®.

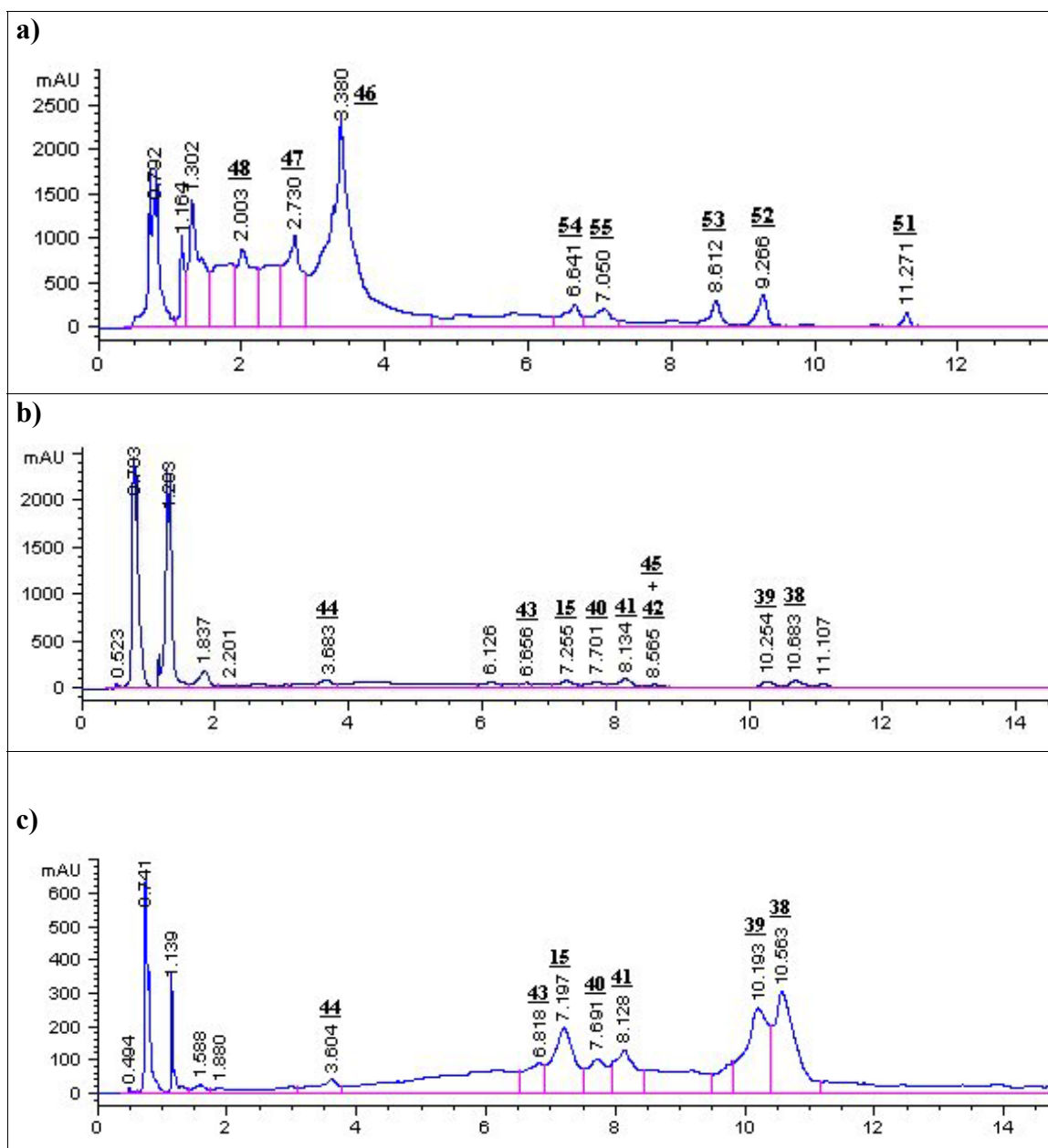


Abb. 16: HPLC-Chromatogramme verschiedener Metabolitenextrakte von **3**

- a) Unkonjugierte Metabolite der sauren Urinextraktfraction
- b) Unkonjugierte Metabolite der basischen Urinextraktfraction
- c) Unkonjugierte Metabolite der basischen Kotextraktfraction

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus der DC stellt die Esterspaltung den dominanten Metabolisierungsweg dar. Verbindung **46** bildet, als das Hydrolyseprodukt von **2**, den Hauptmetaboliten. Die anderen Benzilsäuren treten im Vergleich dazu in weitaus geringerer Menge auf. Es lässt sich abschätzen, dass ca. ein Drittel der Menge an Estern über Urin und zwei Drittel über den Kot ausgeschieden werden. In der Faeces treten dabei besonders die O-dealkylierte Verbindung **38** und das C-oxygenierte Produkt **39** in Erscheinung. Die Ausgangsverbindung **3** kann über die HPLC nicht mehr detektiert werden, wird aber in der DC mit konzentrierter Schwefelsäure (Detektionsmittel B) noch schwach nachgewiesen.

Die UV-Spektren der Benzilatmetabolite zeigen in der Regel ein zweigeteiltes Maximum. Eine Ausnahme bilden Metabolite mit zwei phenolischen Gruppen im Molekül, die einheitliche Maxima aufweisen. Es fallen geringe bathochrome Verschiebungen nach Spaltung der Etherfunktionen bzw. bei zusätzlicher phenolischer Hydroxylgruppe auf.

In Tab. 8 sind die Retentionszeiten und die UV-Absorptionsmaxima der Metabolite von **3** aufgeführt.

### 3.6.1.3 MS-Untersuchungen

(vgl. 3.3.3)

Tab. 9 zeigt die  $M^+$  und Massenfragmente der isolierten Metabolite.

Die Basispeaks bzw. Peaks mit den größten relativen Intensitäten, in Abhängigkeit von der Metabolitenreinheit und -konzentration, werden von den Benzoylkationen **b** und **d** gebildet. Bei den basischen Estern weisen außerdem die Piperidinylfragmente **h**, **i** und **k** hohe relative Intensitäten auf.

Die Molekülionen der basischen Benzilatmetabolite von **3** zeigen im Vergleich mit den entsprechenden Metaboliten von **1**, **2** und **4** die höchste Stabilität, was sich in den größten relativen Intensitäten dieser Ionen ausdrückt.

Tab. 9: EI-MS-Fragmente von **3** und Metaboliten; in ( ) relativer Intensität

Metabolit	M <sup>+</sup>	Fragmenttyp <sup>1)</sup>								
		a	b	c	d	e	f	h	i	k
<u>3</u>	385 (4)	243 (38)	135 (100)	107 (31)			92 (13)	99 (85)	98 (64)	96 (77)
<u>38</u>	371 (5)	229 (29)	135 (39)	107 (21)	121 (97)	93 (34)	92 (17)	99 (75)	98 (87)	96 (98)
<u>39</u>	401 (3)	259 (20)	151 (21)	123 (14)	135 (71)	107 (27)	92 (12)	99 (49)	98 (54)	96 (61)
<u>40</u>	387 (5)	245 (52)	151 (17)	123 (11)	121 (91)	93 (20)		99 (44)	98 (51)	96 (48)
<u>41</u>	357 (8)	215 (23)	121 (75)	93 (31)				99 (36)	98 (63)	96 (82)
<u>42</u>	371 (<1)	243 (26)	135 (58)	107 (25)			92(17)	85 (33)	84 (40)	82 (39)
<u>43</u>	357 (2)	229 (29)	135 (19)	107 (30)	121 (58)	93 (30)	92 (8)	85 (52)	84 (62)	82 (53)
<u>44</u> <sup>2)</sup>	kein M <sup>+</sup> = 387	259 (16)	151(15)	123 (8)	135 (23)	107 (28)	92 (3)	85 (13)	84 (14)	82 (10)
<u>45</u>	399 (2)	243 (34)	135 (75)	107 (28)			92 (11)	Fragment <b>m</b> <sup>3)</sup> 113 (39)		
<u>15</u>	417 (<1)	275 (6)	151 (18)	123 (15)				99 (21)	98 (26)	96 (26)

<sup>1)</sup> vgl. 3.3.3.; <sup>2)</sup> geringe Menge; <sup>3)</sup> vgl. 3.9.2

Fortsetzung Tab. 9: EI-MS-Fragmente von **3** und Metaboliten; in ( ) relativer Intensität

Metabolit	M <sup>+</sup>	Fragmenttyp <sup>1)</sup>					
		a	b	c	d	e	f
<b><u>46</u></b>	288 (1)	243 (28)	135 (100)	107 (45)			92 (19)
<b><u>47</u></b>	274 (<1)	229(8)	135 (45)	107 (29)	121 (76)	93 (18)	92 (16)
<b><u>48</u></b>	kein M <sup>+</sup> = 304	259 (5)	151 (11)	123 (14)	135 (41)	107 (21)	92 (10)
<b><u>49<sup>2)</sup></u></b>	kein M <sup>+</sup> = 290	245 (3)	151 (10)	123 (12)	121 (12)	93 (10)	
<b><u>50</u></b>	nicht rein isolierbar und sehr geringe Substanzmenge						
<b><u>51</u></b>	242 (5)		135 (42)	107 (23)			92 (15)
<b><u>52</u></b>	228 (27)		135 (100)	107 (42)	121 (83)	93 (47)	92 (32)
<b><u>53</u></b>	258 (31)		151 (100)	123 (16)	135 (20)	107 (14)	92 (12)
<b><u>54</u></b>	244 (7)		151 (22)	123 (13)	121 (33)	93 (18)	
<b><u>55</u></b>	214 (19)		121 (63)	93 (32)			

<sup>1)</sup> vgl. 3.3.3; <sup>2)</sup> geringe Menge

### 3.6.2 Identifizierung der Metabolite

Das anhand der besprochenen analytischen Methoden identifizierte Metabolitenspektrum von **3** im Urin der Ratte ist in Schema 10 dargestellt.

Bei den Metaboliten mit zusätzlicher aromatischer Hydroxylgruppe wird die *p*-Position angenommen, da sie allgemein die bei Biotransformationen bevorzugte C-Oxygenierungsstellung darstellt und die *o*- und *m*-Positionen abgeschirmt bzw. wenig reaktionsfähig sind. Die Annahme wird weiterhin durch die negative Reaktion dieser Verbindungen mit EMERSON-Reagenz bestätigt.

Der Ausgangsstoff **3** wird nur in relativ geringer Konzentration wiedergefunden. Im HPLC-Chromatogramm ist er nicht identifizierbar, jedoch in der DC mittels Vergleichssubstanz nachweisbar. Trotzdem gelang es, eine für die Aufnahme eines MS ausreichende Menge rein zu isolieren.

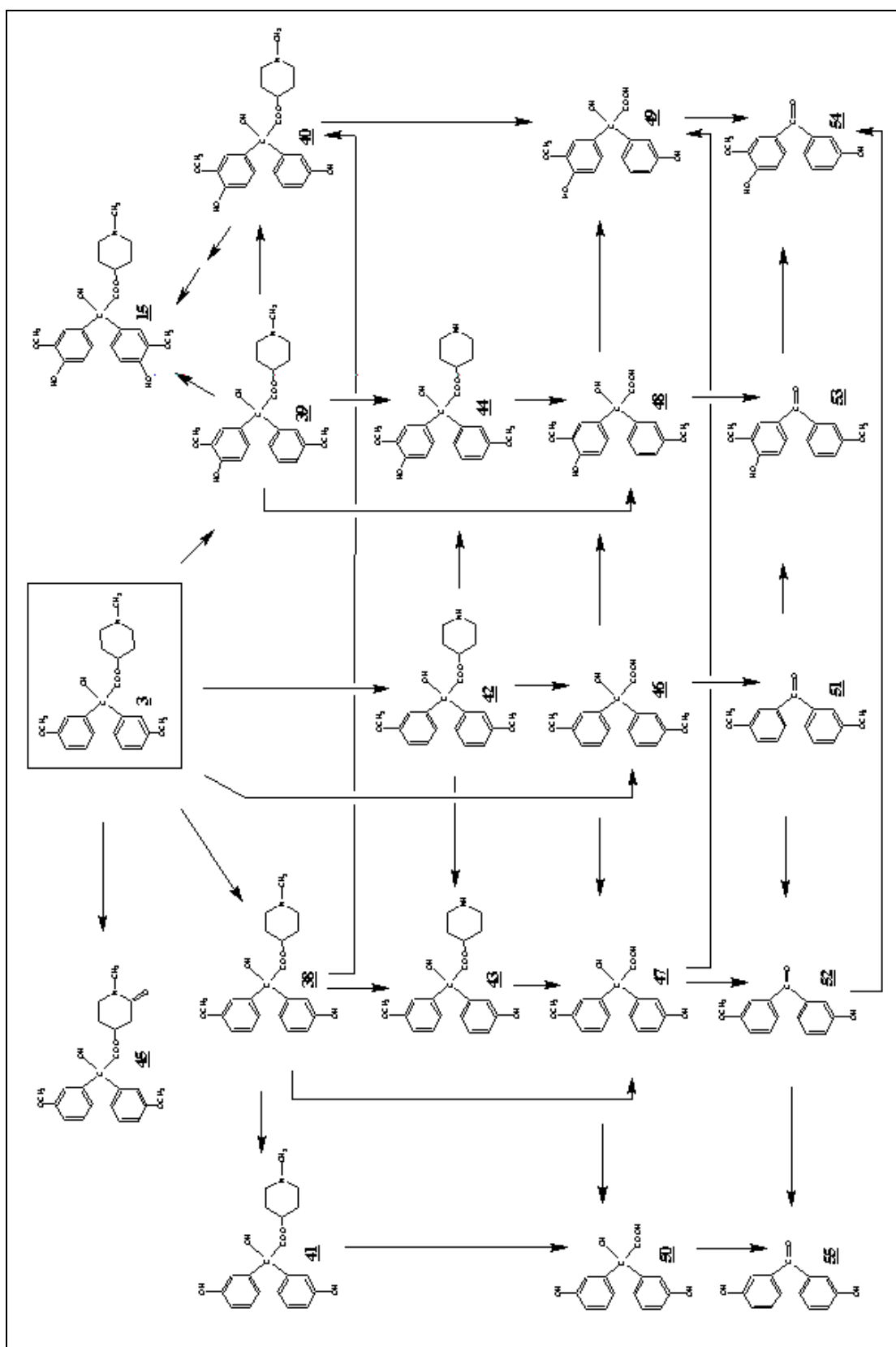
Die Identifizierung der Metabolite **42**, **43** und **44** als N-demethylierte Benzilsäureester erfolgte anhand des MS durch die Molekülionen und die um 14 ME verringerten Piperidinylfragmente. Die aromatische Substitution wurde aufgrund der Benzilatfragmente zugewiesen.

Verbindung **15** tritt ebenfalls bei der Metabolisierung von **1** auf. Die Identität beider Metabolite konnte durch Mischchromatogramme sowohl in der DC, mit gleichartiger Detektion, als auch in der HPLC bestätigt werden.

Metabolit **45** tritt mit dem Molekülion  $m/z$  399 in Erscheinung. Die Fragmentierung deutet auf eine zusätzliche Sauerstofffunktion am Piperidinylrest entweder in Form eines Lactams oder des N-Formylderivats von **3** hin. Mit Hilfe von synthetisierter Vergleichssubstanz konnte diese Verbindung als Lactam identifiziert werden (s. 3.9).

In der sauren Metabolitenfraktion können die Benzilsäuren **46**, **47**, **48** und **49** mit Hilfe von Vergleichssubstanz und des MS bestimmt werden. Nur bei Verbindung **46** tritt im EI-MS ein Molekülpeak auf. Metabolit **50** konnte zunächst nicht in ausreichender Menge und Reinheit isoliert werden, um eindeutige Aussagen mit Hilfe des MS treffen zu können. Er wurde allerdings bei der Biotransformation von **4** identifiziert. Anhand dieser Referenz erfolgte der Nachweis von **50** im nachhinein.

Die Identifizierung der Benzophenone **51**, **52**, **53**, **54** und **55**, die ebenfalls in der sauren Metabolitenfraktion auftreten, erfolgte mit Hilfe der MS. Die Fragmentierungsmuster weisen deutliche Molekülpeaks auf.



Schema 10: Metabolisierung von **3**

### 3.6.3 Phase-II-Metabolite

Nur eine sehr geringe Metabolitenmenge konnte als Phase-II-Metabolite nach Konjugatsspaltung bestimmt werden. Mittels HPLC waren keine eindeutigen Aussagen möglich, so dass die Strukturen dieser Metabolite durch DC-Vergleich mit den vorher identifizierten authentischen Harnmetaboliten aufgeklärt wurden. Zusätzliche, noch nicht identifizierte, Metabolite wurden im Extrakt nicht nachgewiesen. Es konnten keine Benzophenonderivate gefunden werden.

Folgende Verbindungen wurden nachgewiesen:

- (R,S)-N-Methyl-4-piperidyl 4-hydroxy-3,3'-dimethoxybenzilat (**39**)
- (R,S)-N-Methyl-4-piperidyl 3',4-dihydroxy-3-methoxybenzilat (**40**)
- (R,S)-3-Hydroxy-3'-methoxybenzilsäure (**47**)
- (R,S)-4-Hydroxy-3,3'-dimethoxybenzilsäure (**48**)

Es konnten nur phenolische Derivate bestimmt werden.

### 3.6.4 Kotmetabolite

Die Kotmetabolite wurden durch DC- und HPLC-Vergleich mit den identifizierten Harnmetaboliten ermittelt. Zusätzliche, noch nicht identifizierte, Metabolite wurden nicht nachgewiesen. Wie schon in Abb. 16 c) ersichtlich wird eine relativ große Menge an basischen Estern über den Kot ausgeschieden (ca.  $\frac{2}{3}$  der Gesamtmenge dieser Verbindungen – siehe Kapitel 3.6.1.2), wobei **38** und **39** die Hauptmetaboliten darstellen. Die Ausgangssubstanz **3** konnte nicht nachgewiesen werden. In der sauren Metabolitenfraktion ist nur eine geringe Menge an Benzophenonen gefunden worden. Benzilsäuren treten nicht auf.

Folgende Verbindungen wurden nachgewiesen:

- (R,S)-N-Methyl-4-piperidyl 3-hydroxy-3'-methoxybenzilat (**38**)
- (R,S)-N-Methyl-4-piperidyl 4-hydroxy-3,3'-dimethoxybenzilat (**39**)
- (R,S)-N-Methyl-4-piperidyl 3',4-dihydroxy-3-methoxybenzilat (**40**)
- N-Methyl-4-piperidyl 3,3'-dihydroxybenzilat (**41**)
- (R,S)-4-Piperidyl 3-hydroxy-3'-methoxybenzilat (**43**)
- (R,S)-4-Piperidyl 4-hydroxy-3,3'-dimethoxybenzilat (**44**)
- N-Methyl-4-piperidyl 4,4'-dihydroxy-3,3'-dimethoxybenzilat (**15**)



- 3,3'-Dimethoxybenzophenon (**51**)
- 3-Hydroxy-3'-methoxybenzophenon (**52**)
- 4-Hydroxy-3,3'-dimethoxybenzophenon (**53**)
- 3,3'-Dihydroxybenzophenon (**55**)

### **3.7 Metabolisierung von (R,S)-N-Methyl-3-piperidyl 3,3'-dimethoxybenzilat (**4**)**

Insgesamt konnten 22 Metabolite und vermutlich 3 Artefakte, entstanden durch die Aufarbeitung, neben der Ausgangssubstanz **4** isoliert und identifiziert werden. Diese wurden unter Einbeziehung von Vergleichssubstanzen analytisch untersucht. Mit Hilfe von DC- und HPLC-Mischchromatogrammen konnten folgende Verbindungen identifiziert werden:

- die Ausgangsverbindung **4**
- (R,S)-3-Piperidyl 3,3'-dimethoxybenzilat (**60**)
- 3,3'-Dimethoxybenzilsäure (**46**)
- 3,3'-Dimethoxybenzophenon (**51**)
- Methyl 3,3'-dimethoxybenzilat (**68**) (als Artefakt)

Die als Vergleichssubstanzen weiterhin herangezogenen Verbindungen N-Methyl-3-piperidyl 3,3'-dimethoxybenzilat N-oxid, 3-Methoxybenzoesäure, N-Methyl-3-piperidinol und 3-Piperidinol, die potentielle Metaboliten darstellen, konnten nicht nachgewiesen werden.

#### **3.7.1 Analytische Charakterisierung der Metabolite**

##### **3.7.1.1 DC-Untersuchungen**

(vgl. 3.3.1)

Tab. 10 zeigt die Retentionsfaktoren und die Detektion der isolierten Metabolite.

Tab. 10: DC, HPLC und UV-Maxima von (R,S)-N-Methyl-3-piperidyl 3,3'-dimethoxybenzilat (**4**) und Metaboliten

Metabolit	DC						HPLC R <sub>T</sub> [min]	UV- Maxima [nm]
	R <sub>F</sub> -Wert Fließmittel <sup>1)</sup>			Detektion <sup>1)</sup>				
	I	II	III	B <sup>2)</sup>	C	D		
<b><u>4</u></b>	0,74	0,89	0,89	RT-grün H-grau	orange		11,5	276/282
<b><u>56</u></b>	0,47	0,62	0,70	RT-grün H-grau	orange	dunkelrot	7,8	277/283
<b><u>57</u></b>	0,42	0,60	0,80	RT-grün H-grau	orange	dunkelrot	10,9	277/283
<b><u>58</u></b>	0,38	0,58	0,72	RT-grün H-grau	orange	dunkelrot	5,6	281
<b><u>59</u></b>	0,34	0,56	0,73	RT-blaugrün H-blaugrau	orange	dunkelrot	7,1	277/283
<b><u>60</u></b>	0,55	0,82	0,88	RT-grün H-grau	orange		9,4	276/282
<b><u>61</u></b>	0,43	0,52	0,67	RT-grün H-grau	orange	dunkelrot	6,0	277/283
<b><u>62</u></b>	n.d. <sup>3)</sup>			n.d. <sup>3)</sup>			5,2	277/283
<b><u>63</u></b>	n.d. <sup>3)</sup>			n.d. <sup>3)</sup>			keine Zuordnung	
<b><u>64</u></b>	0,36	0,44	0,63	RT-blaugrün H-blaugrau	orange	dunkelrot	5,1	277/283
<b><u>65</u></b>	0,40	0,59	0,74	RT-blau H-hellgrau	orange	dunkelrot	7,3	281
<b><u>66</u></b>	0,23	0,44	0,50	RT-blau H-hellgrau	n.d. <sup>3)</sup>	n.d. <sup>3)</sup>	keine Zuordnung	
<b><u>67</u></b>	0,44	0,55	0,67	RT-grün H-grau	orange	dunkelrot	6,8	277/281

<sup>1)</sup> vgl. 5.4.1.1;

<sup>2)</sup> RT = Raumtemperatur, H = Heizplatte (120 °C);

<sup>3)</sup> n.d. - nicht detektiert

Fortsetzung Tab. 10: DC, HPLC und UV-Maxima von (R,S)-N-Methyl-3-piperidyl 3,3'-dimethoxybenzilat (**4**) und Metaboliten

Metabolit	DC					HPLC R <sub>T</sub> [min]	UV- Maxima [nm]
	R <sub>F</sub> -Wert Fließmittel <sup>1)</sup>			Detektion <sup>1)</sup>			
	I	II	III	B <sup>2)</sup>	D		
<b><u>46</u></b>	0,23	0,28	0,36	RT-grün H-grau		3,4	276/282
<b><u>47</u></b>	0,15	0,23	0,22	RT-grün <sup>3)</sup> H-grau	dunkelrot	2,7	277/283
<b><u>48</u></b>	0,08	0,18	0,16	RT-grün H-grau	dunkelrot	2,0	277/283
<b><u>49</u></b> (n. nachg. <sup>4)</sup> )	0,02	0,10	0,08	RT-grün H-grau	dunkelrot	1,8	281
<b><u>50</u></b>	0,12	0,18	0,22	RT-blaugrün H-blaugrau	dunkelrot	1,5	277/283
<b><u>51</u></b>	0,91	0,94	0,90	gelb		11,2	221, 258, 311
<b><u>52</u></b>	0,56	0,88	0,86	gelb	dunkelrot	9,2	221, 258, 313
<b><u>53</u></b>	0,59	0,40	0,42	gelb	blau	8,4	237, 287, 317
<b><u>54</u></b>	0,40	0,39	0,39	gelb	dunkelrot	6,4	237, 287, 317
<b><u>55</u></b>	0,38	0,23	0,32	gelb	dunkelrot	6,9	219, 261, 313
<b><u>68</u></b>	0,80	0,91	0,92	RT-grün H-grau		9,9	276/282
<b><u>69</u></b>	0,52	0,82	0,84	RT-grün H-grau	dunkelrot	8,0	277/283

<sup>1)</sup> vgl. 5.4.1.1;

<sup>2)</sup> RT = Raumtemperatur, H = Heizplatte (120 °C);

<sup>3)</sup> grün - mit orangem Kern;

<sup>4)</sup> n. nachg. - nicht isoliert nachgewiesen (analytische Daten aus Metabolisierung von **3**)

### 3.7.1.2 HPLC- und UV-Untersuchungen

(vgl. 3.3.2)

Abb. 17 a) zeigt das Chromatogramm der Metabolite der sauren unkonjugierten Urinfraction, Abb. 17 b) das der basischen unkonjugierten Urinfraction jeweils nach Reinigung über Extrelut®.

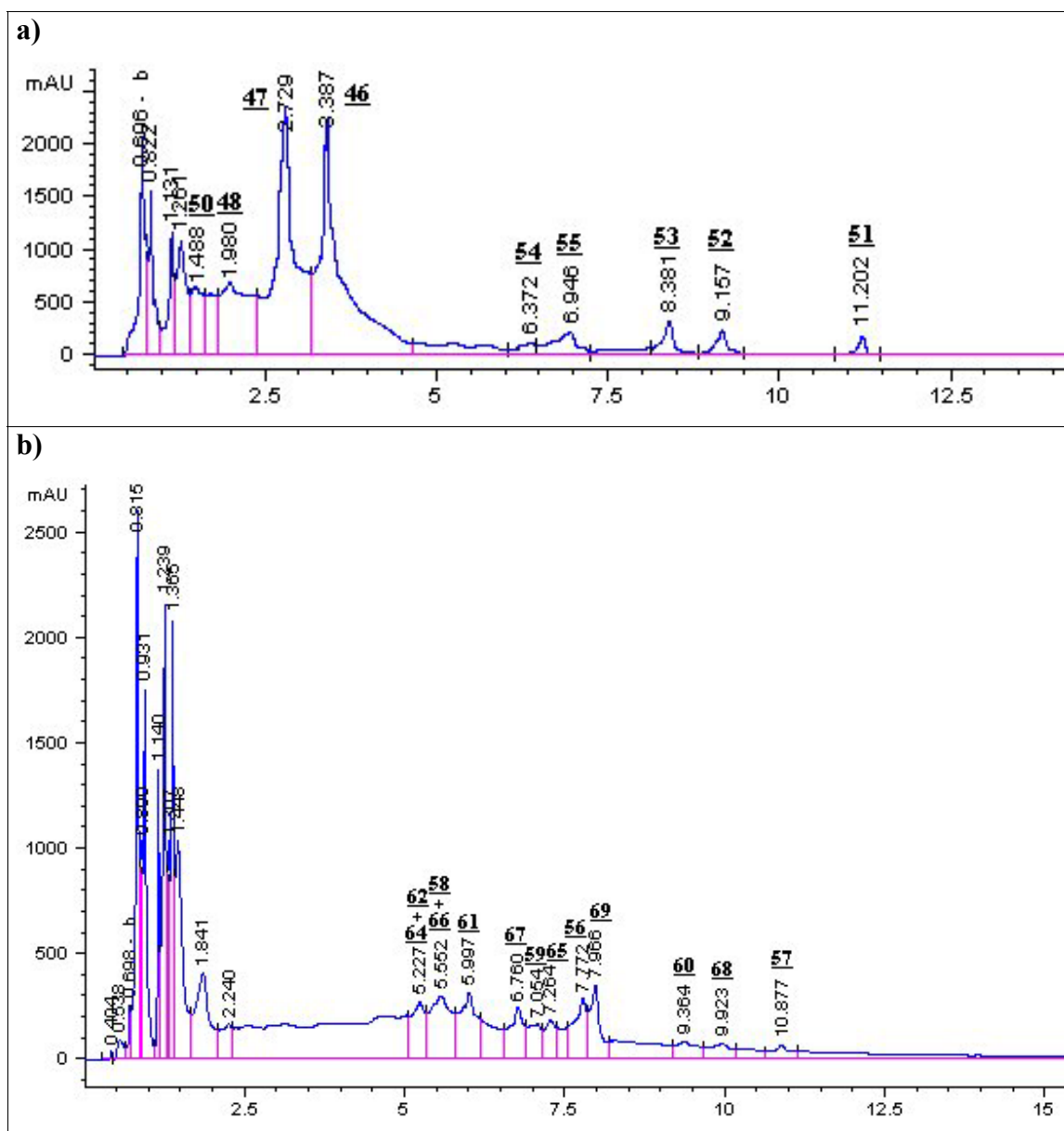


Abb. 17: HPLC-Chromatogramme verschiedener Metabolitenextrakte von 4  
a) Unkonjugierte Metabolite der sauren Urinextraktfraktion  
b) Unkonjugierte Metabolite der basischen Urinextraktfraktion

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der DC stellen die Benzilsäure **46**, als Hydrolyseprodukt von **4**, und die O-dealkylierte Säure **47** die Hauptmetaboliten dar. Im Gegensatz dazu kommt den Estermetaboliten, bezogen auf die Gesamtmetabolitenmenge, nur eine untergeordnete Rolle zu. Dabei bilden die durch einfache Etherspaltung entstandenen phenolischen Ester **56**, **61** und auch das Lactam **67** die Hauptmetaboliten. Aus ihnen kann durch Umesterung das Artefakt **69** entstehen. Im Kot stellen das N-dealkylierte Produkt **60** und das hydroxylierte Derivat **57** die Hauptmetaboliten dar. Insgesamt wird ca. ein Drittel der basischen Ester über die Faeces ausgeschieden.

Eine Etherspaltung und eine zusätzliche phenolische Gruppe führen in den UV-Spektren zu geringen bathochromen Verschiebungen der UV-Maxima. Diese weisen häufig eine Zweiteilung auf. Nur Metabolite mit zwei phenolischen Gruppen zeigen ein einheitliches Maximum.

In Tab. 10 sind die Retentionszeiten und die UV-Absorptionsmaxima der Metabolite von **4** aufgeführt.

### 3.7.1.3 MS-Untersuchungen

(vgl. 3.3.3)

Tab. 11 zeigt  $M^+$  und Massenfragmente der isolierten Metabolite.

Die Basispeaks bzw. Peaks mit den größten relativen Intensitäten, in Abhängigkeit von der Metabolitenreinheit und -konzentration, werden von den Benzoylkationen **b** und **d** gebildet. Bei den basischen Benzilsäureestern kann auch das Radikalkationenfragment **l** den Basispeak stellen.

Tab. 11: EI-MS-Fragmente der Metabolite von 4; in relativer ( ) Intensität

Metabolit	M <sup>+</sup>	Fragmenttyp <sup>1)</sup>									
		a	b	c	d	e	f	h	i	l	k
<u>56</u>	371 (<1)	229 (20)	135 (26)	107 (14)	121 (61)	93 (22)	92 (27)	99 (17)	98 (31)	97 (100)	96 (25)
<u>57</u>	401 (<1)	259 (5)	151 (18)	123 (11)	135 (15)	107 (10)	92 (35)	99 (16)	98 (16)	97 (44)	96 (15)
<u>58</u>	387 (<1)	245 (4)	151 (10)	123 (13)	121 (39)	93 (21)		99 (20)	98 (21)	97 (52)	96 (22)
<u>59</u>	kein M <sup>+</sup> = 357	215 (6)	121 (38)	93 (29)				99 (20)	98 (22)	97 (32)	96 (15)
<u>60</u>	371 (<1)	243 (6)	135 (27)	107 (12)			92 (10)	85 (23)	84 (27)	83 (50)	82 (16)
<u>61</u>	357 (<1)	229 (24)	135 (72)	107 (30)	121 (100)	93 (31)	92 (18)	85 (14)	84 (13)	83 (19)	82 (8)
<u>62<sup>2)</sup></u>	387 (<1)	259 (2)	151 (12)	123 (7)	135 (13)	107 (7)	92 (21)	85 (9)	84 (14)	83 (35)	82 (10)
<u>63<sup>2)</sup></u>	kein M <sup>+</sup> = 387	245 (3)	151(12)	123 (18)	121 (24)	93 (18)		85 (12)	84 (11)	83 (35)	82 (21)
<u>64</u>	kein M <sup>+</sup> = 343	215 (8)	121 (100)	93 (38)				85 (15)	84 (17)	83 (19)	82 (11)
<u>65</u>	kein M <sup>+</sup> = 417	275 (4)	151 (21)	123 (11)				99 (10)	98 (15)	97 (42)	96 (10)
<u>66</u>	kein M <sup>+</sup> = 403	275 (2)	151 (12)	123 (18)				85 (23)	84 (20)	83 (30)	82 (18)
<u>67</u>	385 (1)	229 (15)	135 (35)	107 (20)	121 (100)	93 (32)	92 (11)	Fragment <b>m</b> <sup>3)</sup> 113 (81)			

<sup>1)</sup> vgl. 3.3.3; <sup>2)</sup> geringe Menge; <sup>3)</sup> vgl. 3.9.2

Fortsetzung Tab. 11: EI-MS-Fragmente der Metabolite von **4**; in relativer ( ) Intensität

Metabolit	M <sup>+</sup>	Fragmenttyp <sup>1)</sup>					
		a	b	c	d	e	f
<b><u>46</u></b>	288 (1)	243 (18)	135 (71)	107 (26)			92 (18)
<b><u>47</u></b>	274 (<1)	229(9)	135 (57)	107 (21)	121 (40)	93 (15)	92 (28)
<b><u>48</u></b>	kein M <sup>+</sup> = 304	259 (5)	151 (65)	123 (16)	135 (22)	107 (17)	92 (12)
<b><u>49</u></b>	nicht rein isolierbar und sehr geringe Substanzmenge						
<b><u>50</u></b>	kein M <sup>+</sup> = 260	215 (9)	121 (40)	93 (15)			
<b><u>51</u></b>	242 (14)		135 (100)	107 (40)			92 (29)
<b><u>52</u></b>	228 (33)		135 (100)	107 (41)	121 (92)	93 (42)	92 (28)
<b><u>53</u></b>	258 (11)		151 (65)	123 (16)	135 (22)	107 (17)	92 (12)
<b><u>54</u></b>	244 (6)		151 (9)	123 (22)	121 (32)	93 (20)	
<b><u>55</u></b>	214 (5)		121 (100)	93 (32)			
<b><u>68</u></b>	302 (1)	243 (25)	135 (100)	107 (38)			92 (19)
<b><u>69</u></b>	288 (1)	229 (33)	135 (27)	107 (10)	121 (100)	93 (18)	92 (9)

<sup>1)</sup> vgl. 3.3.3

### 3.7.2 Identifizierung der Metabolite

Das anhand der besprochenen analytischen Methoden identifizierte Metabolitenspektrum von **4** im Urin der Ratte ist in Schema 11 dargestellt.

Bei den Metaboliten mit zusätzlicher aromatischer Hydroxylgruppe wird die *p*-Position angenommen, da sie allgemein die bei Biotransformationen bevorzugte C-Oxygenierungsstellung darstellt und die *o*- und *m*-Positionen abgeschirmt bzw. wenig reaktionsfähig sind. Die Annahme wird weiterhin durch die negative Reaktion dieser Verbindungen mit EMERSON-Reagenz bestätigt.

Die Ausgangssubstanz **4** selbst konnte nur im Kot nachgewiesen werden und wurde mit Hilfe eines Vergleiches über DC und HPLC bestimmt.

Die Identifizierung der Ester erfolgte anhand der Fragmentionen in der MS. Die N-demethylierten Verbindungen wurden durch die um 14 ME verminderten Piperidylfragmente nachgewiesen. Die Molekülpeaks sind nur wenig stabil und fehlen bei den nicht so konzentrierten Metaboliten z. T. völlig.

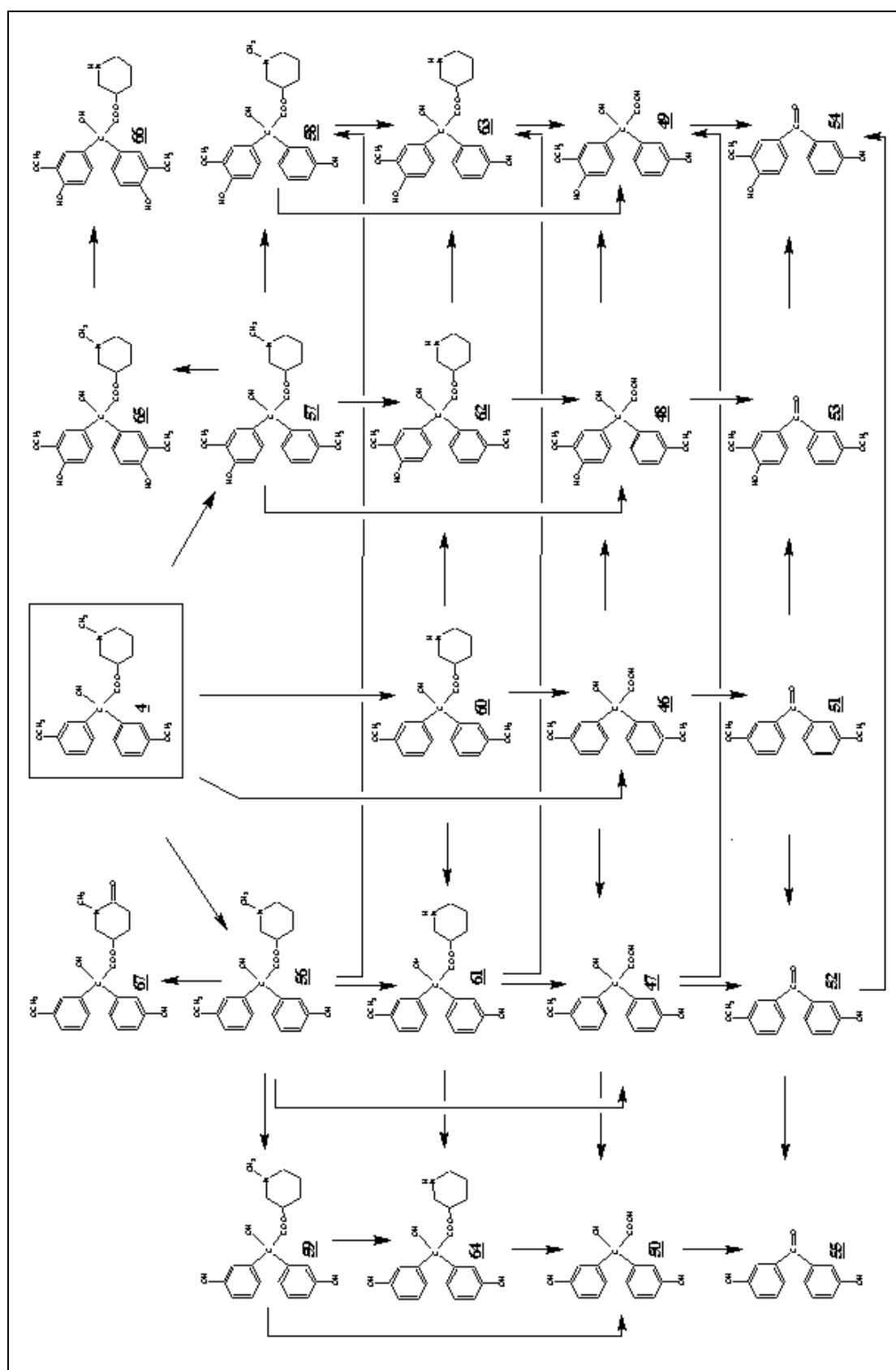
**67** weist mit seinen Fragmentionen auf eine 3-Hydroxy-3'-methoxy-Substitution hin. Der Molekülpeak besitzt eine Masse  $m/z$  385. Dies deutet auf eine zusätzliche Sauerstofffunktion am Piperidinyrest entweder in Form eines Lactams oder einer N-Formylverbindung hin. Aufgrund der in den Metabolisierungsuntersuchungen von **1**, **2** und **3** nachgewiesenen Lactambildung wird diese hier ebenfalls angenommen. Das Lactam vom Ausgangsstoff selbst konnte nicht nachgewiesen werden.

In der sauren Metabolitenfraktion konnten die 4 Benzilsäuren **46**, **47**, **48** und **50** anhand der MS bestimmt werden. Im EI-MS treten nur bei **46** und **47** Molekülpeaks auf. Die Identifizierung von **49** gelang aufgrund der Isolierung dieser Benzilsäure bei der Metabolisierung von **3**. Mit Hilfe der Referenz erfolgte ein Vergleich über DC mit dem sauren Urinextrakt, da **49** aus diesem nicht rein und in ausreichender Konzentration isoliert werden konnte.

Ebenfalls in der sauren Fraktion konnten 5 Benzophenone identifiziert werden. Alle weisen im Massenspektrum deutliche Molekülpeaks auf.

Sowohl für die Benzilsäuren **46**, **47**, **48**, **49** und **50** als auch für die Benzophenone **51**, **52**, **53**, **54** und **55** konnte anschließend die Übereinstimmung mit den bei der Metabolisierung von **3** gebildeten authentischen Verbindungen über Mischchromatogramme der DC gezeigt werden.





## Schema 11: Metabolisierung von 4

Zusätzlich zu den genannten Metaboliten treten die Methylester zweier Benzilsäuren auf (**68**, **69**) (Abb. 18).

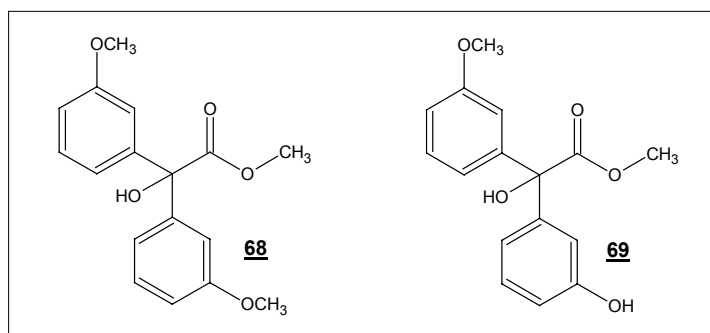


Abb. 18: Artefakte bei der Metabolisierung von **4**

Sie stellen vermutlich Artefakte dar, die während der Aufarbeitung durch Umesterung in Gegenwart von Methanol entstehen. Als Biotransformationsprodukte hätten sie in der ersten eluierten Fraktion der sauren und neutralen Metabolite erscheinen müssen und dürften nicht in der Fraktion der Basen auftreten. Theoretisch können sie im Körper aus Benzilsäuren mit Hilfe von Methyltransferasen gebildet werden.

### 3.7.3 Phase-II-Metabolite

Nur eine geringe Metabolitenmenge konnte als Phase-II-Metabolite nach Konjugat-spaltung bestimmt werden. Sie wurden über DC und HPLC mit identifizierten authentischen Harnmetaboliten als Vergleich nachgewiesen. Zusätzliche, noch nicht identifizierte, Metabolite konnten im Extrakt nicht bestimmt werden.

Es konnten nur phenolische Konjugate identifiziert werden.

Folgende Verbindungen wurden nachgewiesen:

- (R,S)-N-Methyl-3-piperidyl 4-hydroxy-3,3'-dimethoxybenzilat (**57**)
- (R,S)-N-Methyl-3-piperidyl 3',4-dihydroxy-3-methoxybenzilat (**58**)
- (R,S)-3-Piperidyl 4-hydroxy-3,3'-dimethoxybenzilat (**62**)
- (R,S)-4-Hydroxy-3,3'-dimethoxybenzilsäure (**48**)
- 3,3'-Dihydroxybenzilsäure (**50**)
- 3-Hydroxy-3'-methoxybenzophenon (**52**)

### 3.7.4 Kotmetabolite

Die Kotmetabolite wurden über DC und HPLC durch Vergleich mit den identifizierten authentischen Harnmetaboliten ermittelt. Zusätzliche, noch nicht identifizierte, Metabolite wurden nicht nachgewiesen. Anhand der Ergebnisse der HPLC und DC wird eingeschätzt, dass ca. ein Drittel der Menge an basischen Estern über den Kot ausgeschieden wird. Die Verbindungen **60** und **57** stellen die Kothauptmetaboliten dar. In der sauren Metabolitenfraktion konnte nur eine geringe Menge an Benzophenonen gefunden werden, Benzilsäuren treten nicht auf.

Folgende Verbindungen wurden nachgewiesen:

- die Ausgangsverbindung **4**
- (R,S)-N-Methyl-3-piperidyl 3-hydroxy-3'-methoxybenzilat (**56**)
- (R,S)-N-Methyl-3-piperidyl 4-hydroxy-3,3'-dimethoxybenzilat (**57**)
- (R,S)-3-Piperidyl 3,3'-dimethoxybenzilat (**60**)
- (R,S)-3-Piperidyl 3-hydroxy-3'-methoxybenzilat (**61**)
- (R,S)-3-Piperidyl 4-hydroxy-3,3'-dimethoxybenzilat (**62**)
- 3,3'-Dimethoxybenzophenon (**51**)
- 3-Hydroxy-3'-methoxybenzophenon (**52**)
- 4-Hydroxy-3,3'-dimethoxybenzophenon (**53**)
- 3,3'-Dihydroxybenzophenon (**55**)

### 3.8 Einfluss der Dosierung

Bei den Untersuchungen zur Biotransformation der Benzilate **1**, **2**, **3** und **4** konnte keine Abhängigkeit des Metabolitenspektrums aufgrund unterschiedlicher Dosierungen (50, 100 und 200 mg/kg Ratte) festgestellt werden. Die Produkte treten in den Extrakten bei den dosisabhängigen Untersuchungen in gleichen Verhältnissen nur unterschiedlich konzentriert auf. Damit ist eine Beeinflussung der Metabolisierung aufgrund von zu hoher Substanzbelastung in der Studie auszuschließen.

### 3.9 Synthese und analytische Charakterisierung der Lactame

#### 3.9.1 Synthese der Lactame

Bei den Biotransformationsuntersuchungen von **1**, **2**, **3** und **4** treten als typische Metabolite Verbindungen mit einer zusätzlichen Sauerstofffunktion am Piperidinring auf. Die MS dieser Produkte liefern keine eindeutigen Strukturbeweise hinsichtlich einer Unterscheidung von möglichen N-Formylverbindungen oder Lactamen. Es war notwendig, die Lactame auf synthetischem Wege darzustellen, um den direkten Vergleich mit den Metaboliten zu ermöglichen.

Die Lactame der Verbindungen **1** – **4** sind bisher nicht beschrieben worden. Beim Literaturstudium trifft man auf verschiedene Ansätze zur möglichen Synthese. Vielversprechend erscheint dabei deren Darstellung durch Dehydrierung der tertiären Amine mittels Quecksilber-II-EDTA [38, 39, 40, 41, 42]. Auf diese Weise erfolgte durch MÖHRLE u. a. die Synthese des Lactams vom N-Methyl-3-piperidinyl benzilat [43]. Mit Hilfe der Kernresonanzspektren und Synthese von Vergleichssubstanz konnte dem gebildeten Lactam die Struktur des 6-Piperidons und nicht, wie zuerst angenommen, die des 2-Piperidons zugewiesen werden [44, 45]. Voraussetzung für die Reaktion ist eine Hydroxyfunktion in geeigneter Entfernung und sterischer Stellung von der Dehydrierungsstelle. Diese alkoholische Gruppe wirkt durch Bildung eines cyclischen intramolekularen Zwischenzustandes über den Sauerstoff mit dem Primärprodukt der Oxidation, einer elektrophilen Iminiumstruktur, stabilisierend [46, 47]. Mit dieser Methode erfolgte die Synthese der Lactame der N-Methyl-3-piperidyl-ester **2** und **4** problemlos.

Die Darstellung der Lactame der N-Methyl-4-piperidinylderivate ist auf dem Weg der Dehydrierung durch Quecksilber-II-EDTA nicht möglich. Aufgrund einer anderen Stereochemie und einer damit ungünstigen Stellung der Hydroxylgruppe gelingt es wahrscheinlich nicht, ein über eine Sauerstoffbrücke stabiles Intermediärprodukt zu bilden. Auch die in der Literatur beschriebenen Variationen der Synthesebedingungen durch pH-Veränderungen oder Verwendung anderer Dehydrierungsmittel blieben erfolglos [47, 48, 49, 50]. Die Lactamisierung ausgehend vom Alkohol selbst, dem N-Methyl-4-piperidinol, gelang ebenfalls nicht.

Es war nötig, weitere Darstellungswege von Lactamen zu untersuchen. In einer der Biomimetik ähnlichen Umsetzung wird die Lactamisierung mittels Iodosobenzen

beschrieben [51]. Bei der Reaktion mit **1** entsteht jedoch ein Produktgemisch, von dem keine der Verbindungen eine Lactamstruktur aufweist.

Unter Verwendung verschiedener Oxidationsmittel erfolgte die Lactamisierung einiger Alkaloide [52, 53, 54, 55]. Bei der Umsetzung von **1** und **3** mit KMnO<sub>4</sub> entstehen neben den entsprechenden Benzilsäuren und Benzophenonen auch in geringer Ausbeute die Lactame. Diese Reaktion ist stark temperaturabhängig und wird unter Eiskühlung bzw. bei 5 – 10 °C durchgeführt. Bei zu hoher Temperatur wird nur das Benzophenon gebildet, während eine weitere Abkühlung die Reaktion zum Stillstand bringt. Der Einsatz anderer Oxidationsmittel brachte keinen Erfolg. Bei Verwendung von K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] entstehen nur die Hydrolyseprodukte und die Benzophenone.

Bei den hier synthetisierten Lactamen handelt es sich um gelbe Öle, die nicht zur Kristallisation neigen. Die Strukturen wurden mit Hilfe von spektroskopischen Methoden aufgeklärt (vgl. 3.9.2, 5.2.2).

### 3.9.2 Analytik der Lactame - im Vergleich zu den N-Formylderivaten

Bei den Biotransformationsuntersuchungen wurden Metabolite isoliert, deren MS auf eine Lactam- oder N-Formylstruktur hinwies. Nach Synthese der Lactame (vgl. 3.9.1) wurden diese Verbindungen mit Hilfe verschiedener analytischer Methoden, u. a. auch im Vergleich mit den N-Formylderivaten, die durch biomimetische Umsetzung der Ausgangsverbindungen **1**, **2** und **3** gewonnen wurden [4], charakterisiert. Auf diese Weise konnten die Metabolite eindeutig als Lactame identifiziert werden.

DC lassen sich die Verbindungen gut unterscheiden. Tab. 12 zeigt die Laufhöhen von **1**, **2**, **3** und **4** im Vergleich zu den Lactam- bzw. N-Formylderivaten in unterschiedlichen Fließmitteln geordnet nach ansteigenden R<sub>F</sub>-Werten.

Tab. 12: Laufhöhen verschiedener 4-Piperidyl- und 3-Piperidylderivate von **1**, **2**, **3** und **4** in Abhängigkeit des Fließmittels

	Fließmittel I <sup>1)</sup>		Fließmittel II <sup>1)</sup>	
	4-Pip <sup>2)</sup>	3-Pip <sup>3)</sup>	4-Pip <sup>2)</sup>	3-Pip <sup>3)</sup>
R <sub>F</sub> -Wert (ansteigend) ↑	N-Formyl Lactam <b>1/3</b>	N-Formyl <b>2/4</b> Lactame	N-Formyl <b>1/3</b> Lactam	N-Formyl <b>2/4</b> Lactame

<sup>1)</sup> vgl. 5.4.1.1;

<sup>2)</sup> Derivate der N-Methyl-4-piperidylester **1/3**;

<sup>3)</sup> Derivate der N-Methyl-3-piperidylester **2/4**, von **4** keine N-Formylverbindung vorhanden

Die N-Formylprodukte werden mit den Fließmitteln I und II am weitesten transportiert. Bei den 3-Piperidylderivaten folgen daraufhin die Ausgangsester und anschließend die Lactame mit den kleinsten  $R_F$ -Werten. Die Reihenfolge der 4-Piperidylderivate ist dagegen abhängig von der Basizität der Laufmittel. Im schwächer basischen Fließmittel I wird das Lactam weniger retardiert als der basische Ausgangsester, während sich diese Reihenfolge im stark basischen Fließmittel II umkehrt. Allgemein scheinen die 4-Piperidylester einen polareren Charakter als die entsprechende 3-Piperidylderivate zu besitzen, was sich an kleineren  $R_F$ -Werten dieser Isomere äußert. Die  $R_F$ -Werte der 3 verschiedenen Klassen (basischer Ester, Lactam, N-Formylverbindung) liegen bei allen untersuchten Verbindungen jedoch nicht weit entfernt.

Anhand der MS lassen sich die Lactame und N-Formylderivate nicht voneinander unterscheiden. Die Fragmentierung der Benzilsäurestruktur entspricht der unter 3.3.3. beschriebenen. Die Molekülionenpeaks erscheinen mit relativen Intensitäten um 1 %. Sowohl bei den Lactamen als auch den N-Formylderivaten von **1**, **2**, **3** und **4** (hier keine N-Formylverbindung) treten Fragmentationen des Piperidylrestes mit  $m/z$  113 in hoher relativer Intensität auf (vgl. Abb. 19).

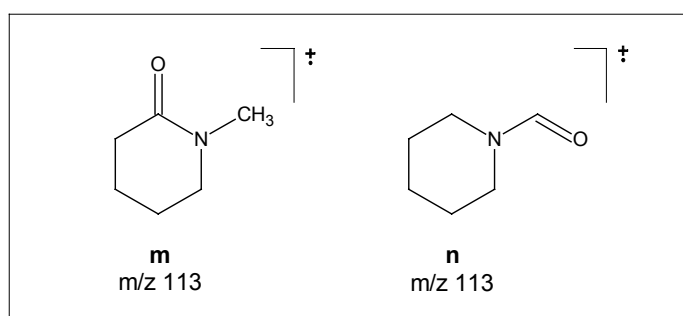
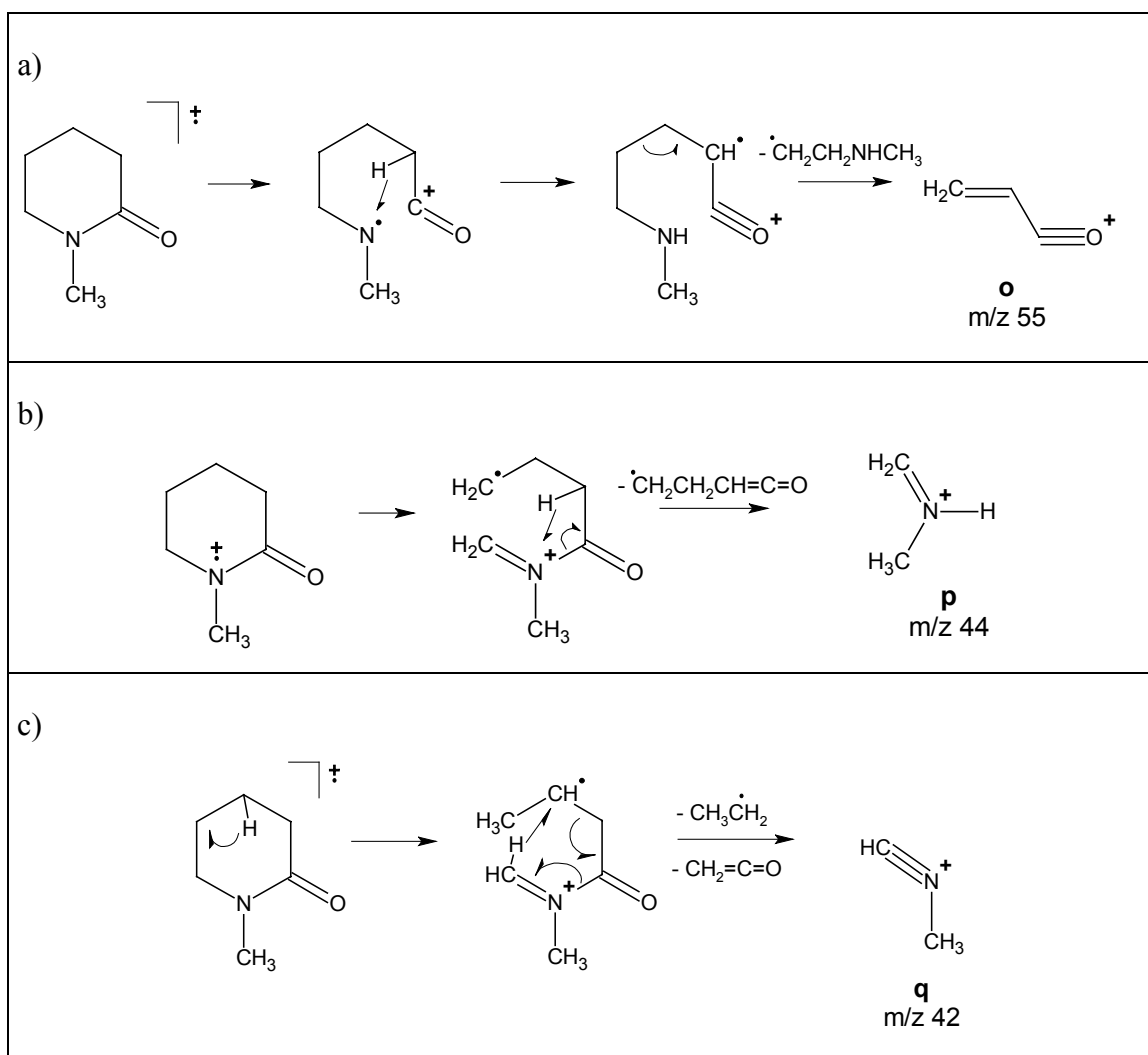


Abb. 19: Fragmentation **m** und Fragmentation **n** bei der Fragmentierung der Lactame bzw. N-Formylderivate von **1**, **2**, **3** und **4** im EI-MS

Die typischen Fragmentationen der Piperidinringe **i**, **k** und **l** treten nicht auf (vgl. 3.3.3). Bei den Lactamen kommt es unter weiterem Zerfall von **m** zur Bildung der Fragmentkationen **o** mit  $m/z$  55, **p** mit  $m/z$  44 und **q** mit  $m/z$  42. Die Bildung dieser Ionen war bei den Metabolismusstudien jedoch nicht zur Unterscheidung zu den N-Formylpiperidinyilverbindungen geeignet, da einerseits die biologischen Verunreinigungen in den isolierten Metabolitenfraktionen stören und andererseits die N-Formylverbindungen ebenfalls Fragmentationen mit diesen Massezahlen bilden. Zur Vollständigkeit soll die Entstehung der Fragmenionen dennoch kurz erläutert werden (Schema 12) [56, 57].



Schema 12: Weitere Fragmentierung des Lactamringes

- a) Bildung des Fragments **o**
- b) Bildung des Fragments **p**
- c) Bildung des Fragments **q**

Die Bildung des Fragmentes **o** wird durch eine Ringspaltung gefolgt von einer Wanderung des Wasserstoffes von Position 3 eingeleitet. Durch Homolyse der Bindung zwischen Position 4 und 5 bildet sich dann das resonanzstabilisierte Ion (Schema 12 a).

Eine alternative Spaltung des Lactamringes, gefolgt von Wasserstofftransfer zum Stickstoff, führt zu Fragment **p** und einem resonanzstabilisierten Keten-Radikal (Schema 12 b).

Durch Wasserstofftransfer mit nachfolgender Abspaltung eines Ethylradikals und eines Ketens entsteht das Fragment **q** (Schema 12 c).

Bei GC-MS-Messungen fällt auf, dass sowohl die Lactame als auch die N-Formylverbindungen schwerer verdampfbar sind als ihre basischen N-Methyl-piperidinylester.

Bei diesen Untersuchungen lassen sich die Lactame aufgrund kleinerer  $R_T$ -Werte gegenüber den N-Formylverbindungen unterscheiden (vgl. 5.2.2).

Die Strukturunterscheidung zwischen Lactamen und N-Formylbenzilaten ist eindeutig durch Kernresonanzspektroskopie möglich. So tritt im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum das Signal der N-Formylgruppierung bei 7,9 ppm auf, während bei den Piperidinonen kein solches in diesem Bereich erscheint (vgl. 5.2.2; vgl. Abb. 20). Eine weitere Unterscheidungsmöglichkeit bietet sich aufgrund des Spektrums des Piperidinyrestes. Die N-Methyl-Gruppe aller Lactame gibt ein starkes Signal  $\sim 2,75$  ppm und erscheint im Gegensatz zum entsprechenden Signal bei den Ausgangsestern **1**, **2**, **3** und **4** ( $\sim 2,1$  ppm) durch die Sauerstofffunktion entschirmt und tieffeldverschoben. Die N-Formylverbindungen können dieses Spektrum aufgrund des Fehlens der Methylgruppe nicht geben. Weitere Unterschiede im  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum der Lactame, N-Formyl-piperidinybenzilate und Ausgangsester ergeben sich aus den Signalen der Protonen der Heterocyclen. Allgemein auffällig ist die Entschirmung und somit Tieffeldverschiebung der Protonensignale des Piperidinyrestes und der Hydroxylgruppe der Lactame gegenüber den Ausgangsverbindungen. Abb. 20 stellt beispielhaft das  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum des Lactams **32** (Lactam von **2**) dar.

Die weitere Strukturzuordnung erfolgte mit Hilfe der  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektroskopie. Die Unterscheidung ist anhand der Oxo-Signale der funktionellen Gruppen (N-Formyl- bzw. Lactam-) möglich. Obwohl diese Signale bei ähnlichen Verschiebungen auftreten (vgl. 5.2.2), ist die Differenzierung aufgrund der  $^{13}\text{C}$ -NMR-APT-Aufnahmetechnik möglich. Mit dieser Methode können Aussagen über eine gerade oder ungerade Anzahl von Protonen am Kohlenstoff getroffen werden. In Abb. 21 ist das  $^{13}\text{C}$ -NMR-APT-Spektrum des Lactams **32** (Lactam von **2**) dargestellt. Bei der N-Formylverbindung weist das Signal der Oxogruppe des Aldehyds aufgrund eines Wasserstoffatoms nach oben. Beim Lactam dagegen ist das C=O-Signal des Amids (C-20) nach unten gerichtet, da kein Wasserstoff direkt gebunden ist. Zur weiteren Unterscheidung dient ebenfalls die N-Methyl-Gruppe, die als deutlicher Peak (C-19) im Lactamspektrum sichtbar ist.

Bei den Verbindungen **2** und **4** besteht theoretisch die Möglichkeit der Bildung eines isomeren Lactams - des N-Methyl-2-oxo-3-piperidyl benzilats - und nicht des N-Methyl-6-oxo-3-piperidyl benzilats. Dies konnte durch NMR-Untersuchungen widerlegt werden (vgl. 3.9.1, [45]). Zur Unterstützung wurden die  $^1\text{H}$ -NMR- und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren dieser Isomere berechnet. Im  $^1\text{H}$ -NMR ist als Unterscheidungs-



kriterium das Signal vom C-15 geeignet. Dieses liegt im berechneten Spektrum des N-Methyl-2-oxo-3-piperidyl benzilats bei 5,75 ppm und des N-Methyl-6-oxo-3-piperidyl benzilats bei 5,16 ppm. Der gemessene Wert von 5,24 ppm weist damit auf das letzte Lactam. In Tab. 13 sind die berechneten und gemessenen Verschiebungen der möglichen Isomere im  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum dargestellt.

Tab. 13: Vergleich des gemessenen  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrums von **32** mit den berechneten Spektren der möglichen isomeren Lactame

C-Atom <sup>1)</sup>	<b>32</b> (gem.)	I <sup>2)</sup> (ber.)	II <sup>3)</sup> (ber.)	C-Atom <sup>1)</sup>	<b>32</b> (gem.)	I <sup>2)</sup> (ber.)	II <sup>3)</sup> (ber.)
1	133,7	130,1	130,8	12	128,0	126,0	125,3
2	110,4	111,1	110,5	13	80,8	79,6	84,0
3	148,7	151,2	151,2	14	173,7	172,0	173,7
4	148,5	148,5	148,5	15	68,3	71,4	77,2
5	110,2	114,3	114,3	16	27,0	27,8	29,0
6	119,7	118,2	117,6	17	25,1	26,9	20,7
7	141,5	140,4	141,2	18	52,6	52,2	49,6
8	128,0	126,0	125,3	19	34,3	34,7	34,3
9	126,9	128,7	128,7	20	168,7	168,8	167,5
10	128,0	128,3	128,3	21	55,7	56,0	56,0
11	126,9	128,7	128,7	22	55,7	56,0	56,0

gem. - gemessen; ber. - berechnet; <sup>1)</sup> - Bezifferung vgl. Abb. 20, Abb. 21

<sup>2)</sup> - (R,S)-N-Methyl-6-oxo-3-piperidyl 3,4-dimethoxybenzilat

<sup>3)</sup> - (R,S)-N-Methyl-2-oxo-3-piperidyl 3,4-dimethoxybenzilat (C-18 und C-20 in Bezifferung vertauscht)

Anhand der Näherung zum gemessenen  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum im besonderen bei den Atomen C-13, C-15 und C-17 und aufgrund der Ergebnisse der  $^1\text{H}$ -NMR wird die Verbindung als (R,S)-N-Methyl-6-oxo-3-piperidyl 3,4-dimethoxybenzilat identifiziert. Das synthetisierte Lactam von **4** wurde auf diese Weise als N-Methyl-6-oxo-3-piperidyl 3,3'-dimethoxybenzilat identifiziert, tritt jedoch nicht bei den Metabolisierungsuntersuchungen in Erscheinung. Bei den Estern **1** und **3** ist das Vorkommen von strukturisomeren Lactamen nicht möglich.

Mit Hilfe dieser strukturiesicherten Vergleichssubstanzen erfolgte die Strukturzuordnung der Metabolite **13**, **32** und **45**.

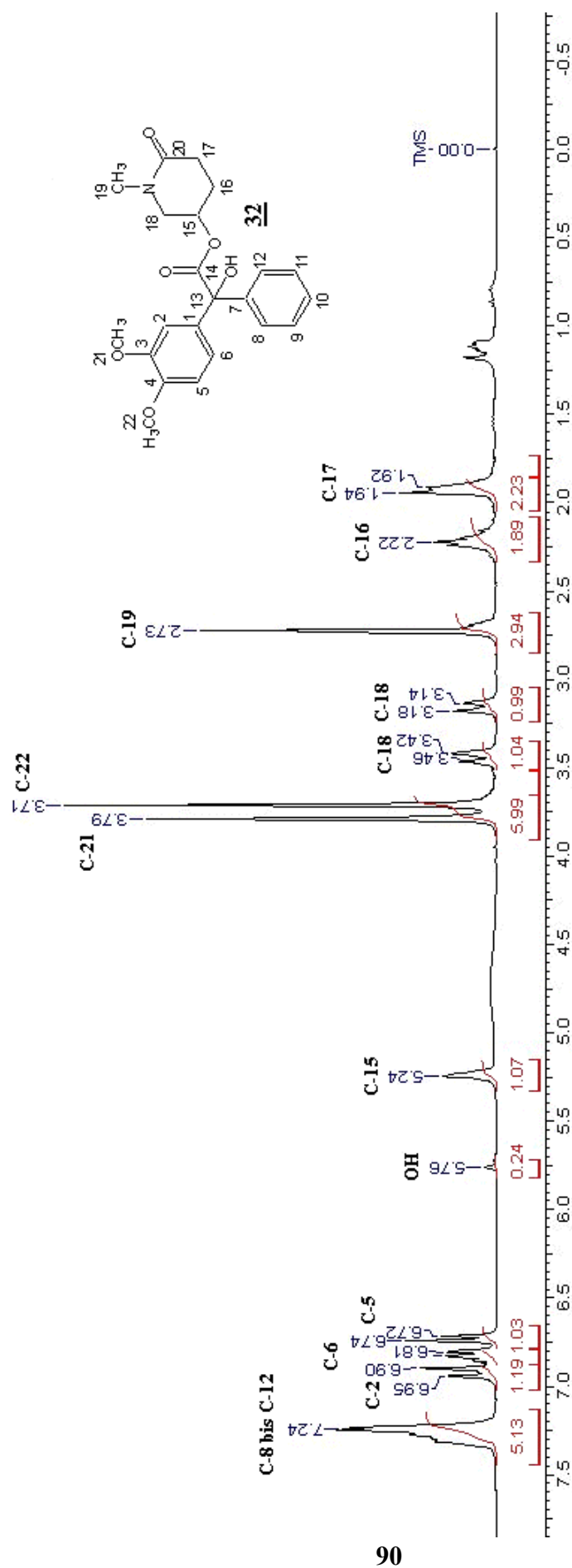


Abb. 20: <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum von **32**

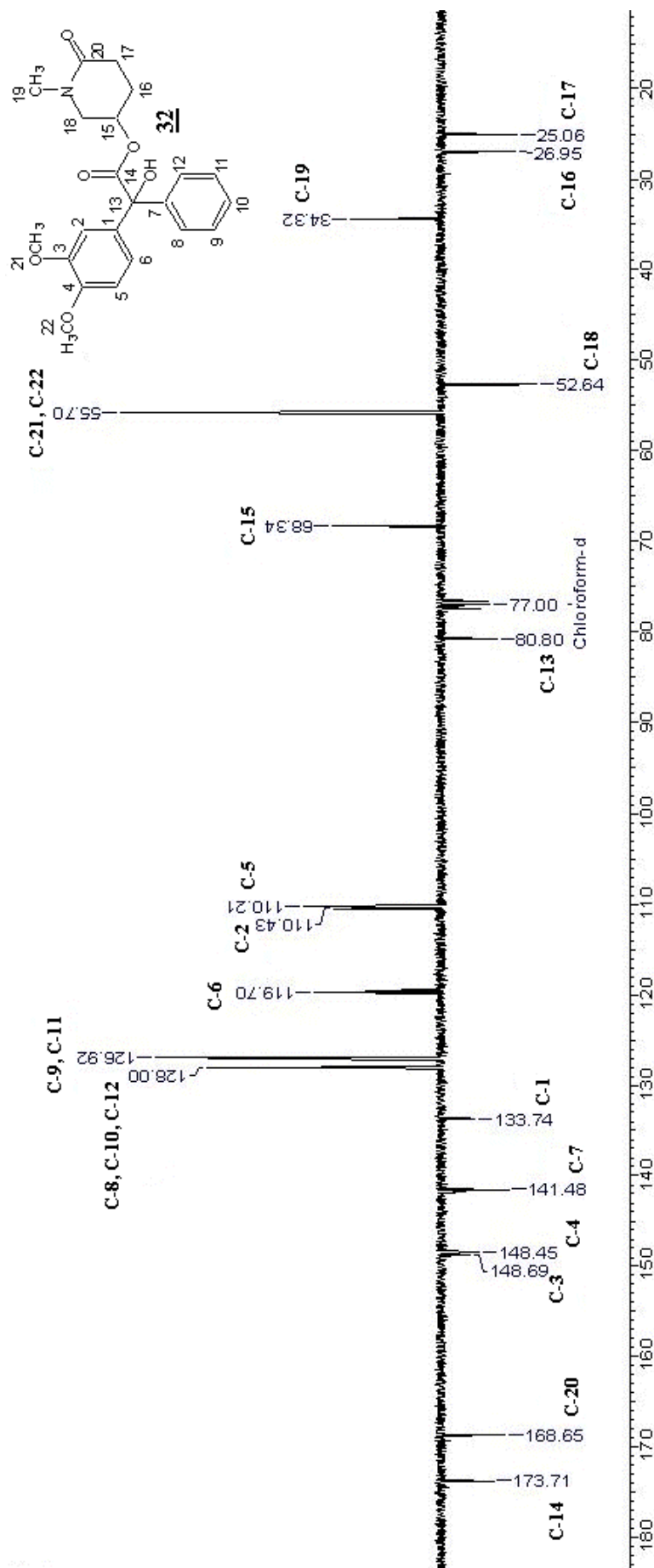


Abb. 21: <sup>13</sup>C-NMR-APT-Spektrum von **32**

## 4 Diskussion

### 4.1 Biotransformation unter Berücksichtigung der Reaktionsmechanismen

Die Verbindungen 1, 2, 3 und 4 unterliegen nach oraler Applikation im Rattenorganismus vielfältigen Veränderungen unter Bildung zahlreicher Metabolite. Dabei treten folgende Funktionalisierungsreaktionen auf:

Phase I:

- Esterspaltung
- N-Dealkylierung
- Lactambildung
- N-Oxidbildung
- Oxigenierung am Aromaten (Aromatische Hydroxylierung)
- O-Dealkylierung
- Oxidation zu Benzophenonen

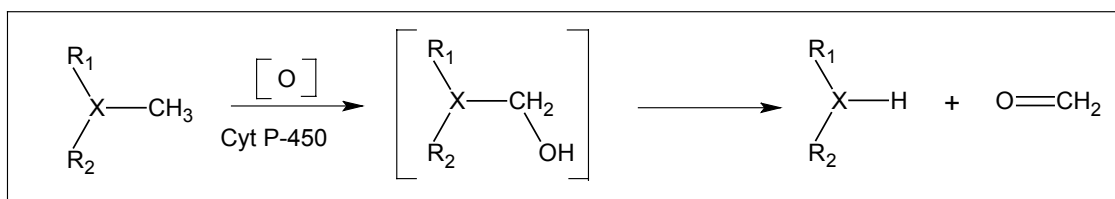
Phase II:

- Methylierung phenolischer Hydroxylgruppen
- Konjugationsreaktionen (Sulfatkonjugate und/oder Glucuronide)

Die Ester werden im Körper schnell durch unspezifische Esterasen hydrolysiert. Dabei entstehen die entsprechenden Benzilsäuren und Aminoalkohole, wobei der Nachweis der letzteren nicht gelang, da sie vermutlich sehr schnell weiter abgebaut werden. Die Benzilsäuren selbst und die aus ihnen gebildeten Benzophenone stellen einen großen Teil der Metabolite dar, was auf eine hohe Esteraseaktivität schließen lässt. Bei verschiedenen Benzilsäureestern konnte die Hydrolysierbarkeit durch eine Schweineleberesterase dokumentiert werden [58]. Vor einiger Zeit wurden auch oxidative Esterspaltungen mit Cyt P-450-Enzymen für einige Calcium-Kanal-Antagonisten vom Dihydropyridintyp nachgewiesen [59]. Welche Rolle sie jedoch allgemein bei der Biotransformation spielen, bleibt noch abzuwarten. Biomimetisch wurde die oxidative Esterspaltung für die Verbindung 1 nachgewiesen [4].

Oxidative N- und O-Dealkylierungen sind vielfach beschrieben. Dabei erfolgt zunächst, begünstigt durch den induktiven Effekt des Heteroatoms am  $\alpha$ -C-Atom, eine durch Cyt P-450 vermittelte C-Oxigenierung unter Bildung eines Alkohols. Dieser ist nicht sehr

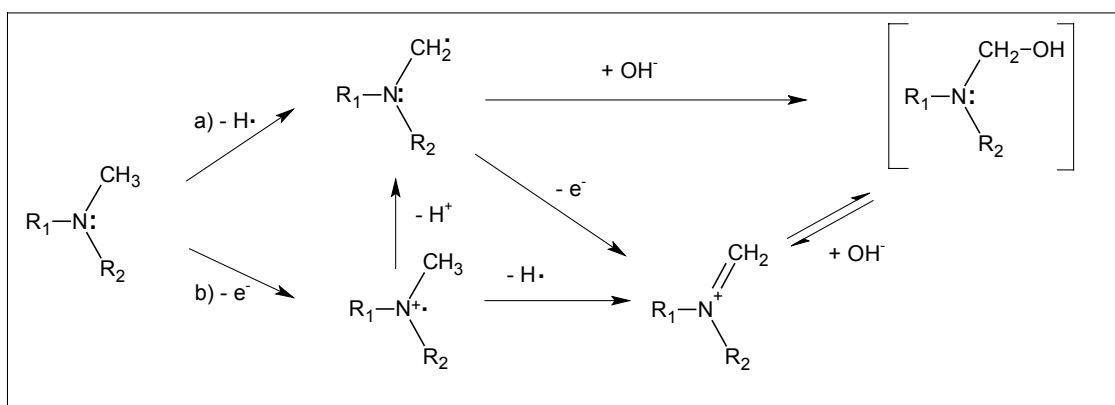
stabil und zerfällt nichtenzymatisch in das dealkylierte Produkt und den Aldehyd (bzw. ein Keton) (Schema 13). Bei N-Dealkylierungen ist neben der Abspaltung des Aldehyds vom Carbinolamin noch eine weitere Reaktion denkbar – die Bildung von N-Formyl-derivaten durch Oxidation. Sie sind auch in verschiedenen Beispielen nachgewiesen, u. a. auch bei den zwei Diphenylmethanderivaten Recipavrin [60] und Fenoctimin [61]. Bei diesen Metabolisierungsuntersuchungen tritt diese Veränderung jedoch nicht in Erscheinung.



Schema 13: Allgemeiner Mechanismus von Dealkylierungen am Heteroatom (X)

In einigen Fällen konnten Carbinolamine auch als stabile Metabolite nachgewiesen und isoliert werden, z. B. bei der Biotransformation von N-Methylcarbazol. Die Stabilität ist vermutlich durch die geringe Basizität des Stickstoffs bedingt [62].

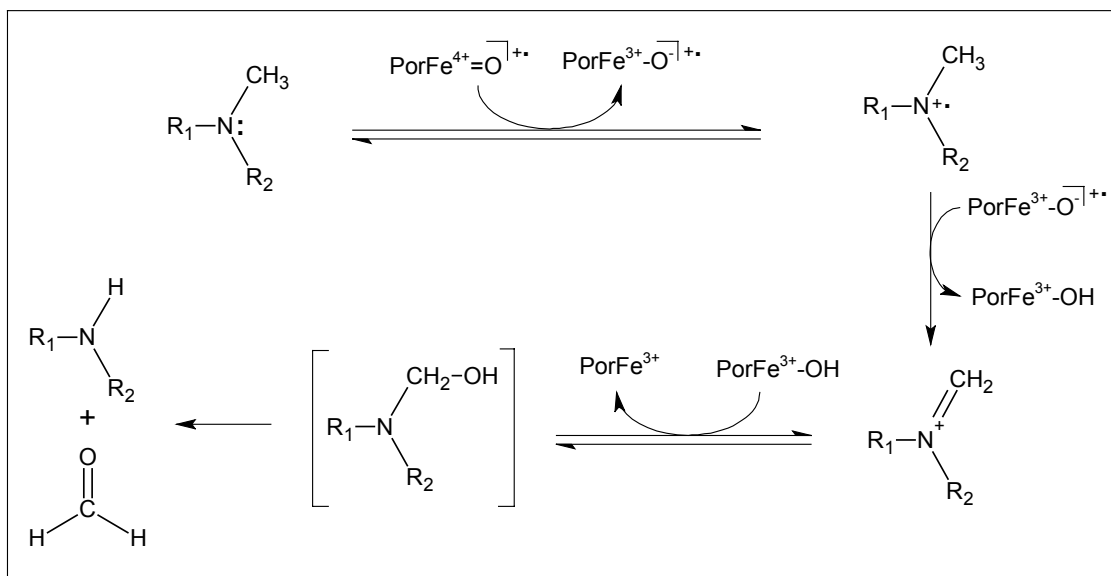
Bei der N-Dealkylierung ist die Bildung der  $\alpha$ -Hydroxyverbindung auf zwei, durch Cyt P-450 vermittelten Wegen, möglich. Auf dem Weg a) kommt es zu einer Abstraktion eines Wasserstoffatoms am  $\alpha$ -C-Atom gefolgt entweder von der Oxigenierungsreaktion oder zunächst der Bildung des Iminiumions. Auf Weg b) dagegen erfolgt zuerst ein Elektronentransfer mit nachfolgender Deprotonierung oder Wasserstoff-Abstraktion und Bildung des Iminiumions. Durch Oxigenierung entsteht das Carbinolamin (Schema 14).



Schema 14: Mögliche Reaktionswege zur Bildung eines Carbinolamins bei der Dealkylierung am Beispiel eines tertiären Amins

Bei oxidativen N-Dealkylierungen wurden Nachweise für beide Mechanismen dokumentiert [63]. So konnten Übereinstimmungen gezeigt werden in den kinetischen Deuteriumisotopieeffekten bzw. Isotopieeffektprofilen der N-Demethylierung von N,N-Dimethylanilinen, ausgelöst durch ein *tert*-Butyloxyradikal, für die die Wasserstoffabstraktion als gesichert gilt, im Vergleich zu N-Dealkylierungsreaktionen an isolierten Cyt P-450-Isoenzymen. Daraus wurde geschlussfolgert, dass die N-Demethylierung durch eine Wasserstoffatomabstraktion initiiert abläuft [64, 65].

Im Gegensatz dazu stehen Untersuchungen, die bei Vergleich von O-Dealkylierungen und N-Dealkylierungen Unterschiede in den kinetischen Isotopieeffekten aufweisen, was auf unterschiedliche Reaktionsmechanismen deutet [66, 67]. Die Ergebnisse wurden so interpretiert, dass O-Dealkylierungen über eine Wasserstoff- und N-Dealkylierungen über eine Elektronenabstraktion ablaufen. Dies wird weiterhin dadurch gestützt, dass bei Verringerung der Basizität z. B. durch elektronenziehende Gruppen eine Veränderung der kinetischen Isotopieeffekte erfolgt. Diese ähneln nun stark den Werten der O-Dealkylierung. Der daraus resultierende Reaktionsmechanismus der N-Dealkylierung unter Einbeziehung von Cytochrom P-450 ist in Schema 15 dargestellt [2].



Schema 15: Möglicher Mechanismus der N-Dealkylierung  
(PorFe - Cytochrom P-450)

Auf welchen Reaktionswegen die Bildung des Carbinolamins erfolgt, hängt demzufolge stark von der Situation im Molekül (Substituenten, aromatische, cyclische oder acyclische Bindung des Stickstoffs) ab.

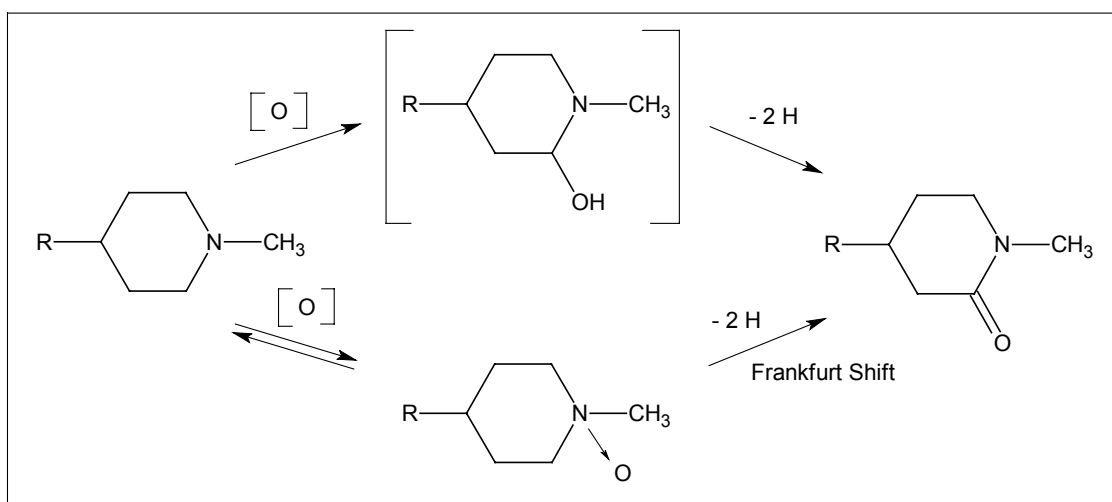
Auch für O-Dealkylierungen werden substratabhängige Reaktionsmechanismen diskutiert [68]. Allgemein wird jedoch angenommen, dass diese Reaktion durch Abstraktion eines Wasserstoffradikals (Weg a) initiiert wird. Die Spaltung der *p*-Methoxy- und nicht der *m*-Methoxygruppe bei der Metabolisierung von **1** und **2** lässt sich anhand der elektronischen Verhältnisse im Molekül erklären. Das zentrale C-Atom kann formal als Alkylgruppierung und damit als Substituent 1. Ordnung aufgefasst werden, der die Ladungsdichte in *o*- und *p*-Stellung erhöht. Dadurch steigt die Elektronendichte am Ethersauerstoff der *p*-Methoxygruppe gegenüber der in *m*-Stellung und führt zu einer erhöhten Reaktivität dieser Methoxyfunktion.

Ein weiterer postulierter Mechanismus zur Bildung von N-Dealkylierungsprodukten führt über das N-Oxid. Dieses N-Oxid kann einer Umlagerung zum Carbinolamin unterliegen und unter Abspaltung des Aldehyds oder Ketons zum N-Dealkylierungsderivat reagieren [69, 70].

Am basischen N-Methyl-piperidinyrest konkurrieren neben der N-Demethylierung zwei weitere Reaktionen - die N-Oxid- und die Lactambildung.

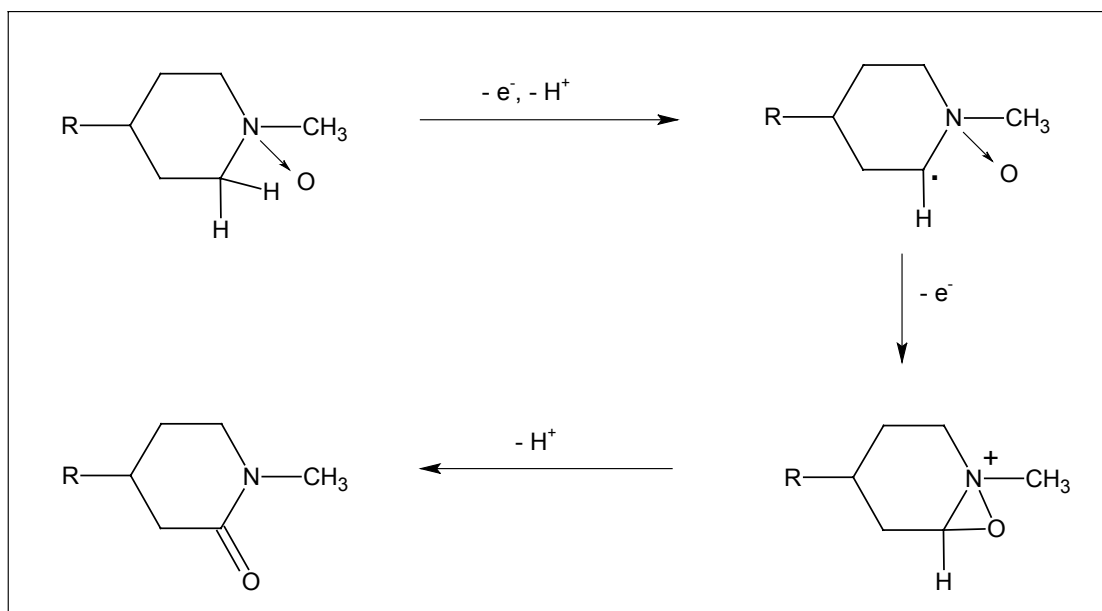
Aus tertiären Aminen entstehen vermittelt durch Cyt P-450-abhängige NADPH-abhängige Monooxygenasen N-Oxide. Sie sind stark polar und werden in der Regel schnell eliminiert. Nur bei **1** konnte eine N-Oxidbildung nachgewiesen werden. Diese Bildung ist allerdings bei der Metabolisierung der anderen Substanzen nicht auszuschließen, da N-Oxide zu anderen Verbindungen weiterreagieren können. So ist ihre Rolle bei der Entstehung der Lactame und N-Dealkylierungsprodukte belegt [69, 70, 71, 72]. Unter Umlagerung des Sauerstoffes entstehen zunächst die jeweiligen Carbinolamine, die zu den entsprechenden Produkten weiterreagieren können. Es ist ebenfalls möglich, dass N-Oxide zur Ausgangsverbindung zurück reduziert werden.

Lactambildung wurde bisher bei vielen Untersuchungen von tertiären cyclischen Aminen festgestellt. Sie tritt u. a. bei der Biotransformation von Nicotin [73], N-Benzylpiperidin [74] und verschiedenen Phenothiazinen vom Piperidintyp auf [75, 76, 77, 78]. Auch bei den hier untersuchten Piperidylestern **1**, **2**, **3** und **4** wurden Lactame nachgewiesen. Zwei mögliche Bildungswege werden heute akzeptiert (Schema 16).



Schema 16: Reaktionsmechanismus zur Bildung von Lactamen

Der seit langem anerkannte obere Weg führt, ähnlich wie bei der N-Dealkylierung, über ein Carbinolamin, das durch eine schnell ablaufende Dehydrierung das 2-Oxoderivat bildet. Versuche mit N-(4-Fluorbenzyl)-pyrrolidin- $^{18}\text{O}$ -N-oxid brachten den Nachweis einer Konkurrenzreaktion über das N-Oxid, die ebenfalls zum Lactam führt [71, 72]. Der dabei von OELSCHLÄGER postulierte Mechanismus für den Frankfurt Shift ist übertragen auf einen Piperidinring in Schema 17 dargestellt.



Schema 17: Möglicher Mechanismus des Frankfurt Shift

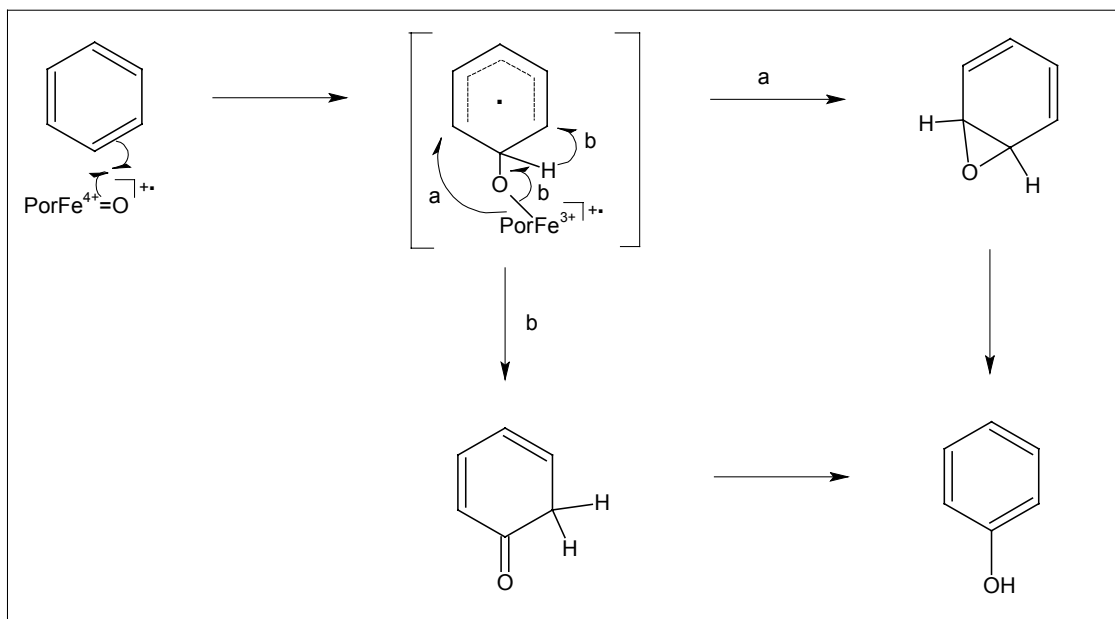
Diese Reaktion erfolgt durch die Abstraktion eines Protons und zweier Elektronen vom N-Oxid vermutlich vermittelt durch Cyt P-450, wobei als kurzzeitiges Intermediat ein Oxaziridiniumion entsteht, das sich durch Abspaltung eines Protons zum Lactam



stabilisiert. Eine nichtenzymatische Umwandlung von N-Oxiden zu Lactamen konnte ausgeschlossen werden.

Ringöffnungen nach Bildung des Lactams zu Aminosäuren wie z. B. bei Prolintan [79], werden selten beobachtet und treten bei der Metabolisierung von **1**, **2**, **3** und **4** nicht auf. Eine weitere wichtige erfolgte Biotransformationsreaktion stellt die aromatische C-Oxygenierung dar. Es sind zwei Reaktionsmechanismen bekannt, die zur Bildung phenolischer Produkte führen können. Sauerstoff kann, vermittelt durch Cyt P-450, direkt über radikalische Zwischenstufen in eine C-H-Bindung eingeführt werden. Für viele phenolische Metabolite wird jedoch ein anderer Mechanismus diskutiert, bei dem zunächst eine Epoxidierung der aromatischen Verbindung erfolgt. Die entstehenden Arenoxide können u. a. zu Phenolen umgelagert werden.

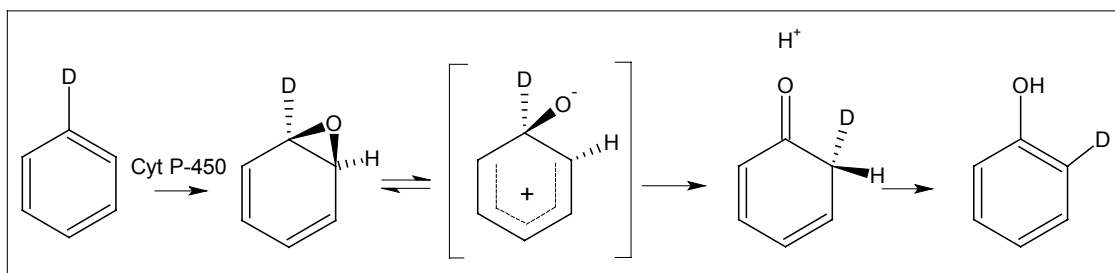
Nach Untersuchungen mit isotoopenmarkierten Verbindungen wird dabei auch ein Additions-Umlagerungs-Mechanismus diskutiert, der als Zwischenprodukt ein Arenoxid oder, ähnlich wie bei der Oxygenierung an Alkenen, ein Keton aufweist (Schema 18) [2].



Schema 18: Möglicher Mechanismus zur Bildung von Phenolen (Additions-Umlagerungs-Mechanismus); (PorFe – Cytochrom P-450)

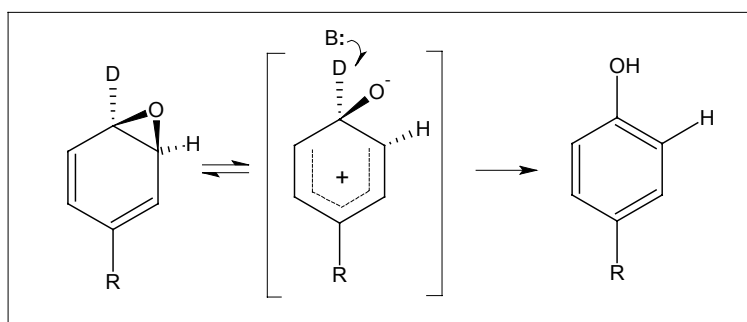
Die als Zwischenprodukte entstehenden Arenoxide isomerisieren nichtenzymatisch zum Phenol. Dabei wandert das ursprünglich an der phenolischen Substitutionstelle gebundene Wasserstoffatom (D) zur Nachbarposition. Diese intramolekulare Wanderung wird als NIH-Shift bezeichnet [80] und ist auch für andere kleine

Substituenten, z. B. Halogen oder Methylgruppen, nachgewiesen (Schema 19) [81].



Schema 19: NIH-Shift

In einer Konkurrenzreaktion zum NIH-Shift kann es zu einer Dedeuterierung kommen. Diese ist bevorzugt, wenn das intermediär gebildete Carbokation durch eventuelle Substituenten stabilisiert werden kann, z. B. bei Substituenten 1. Ordnung (Schema 20) [2].

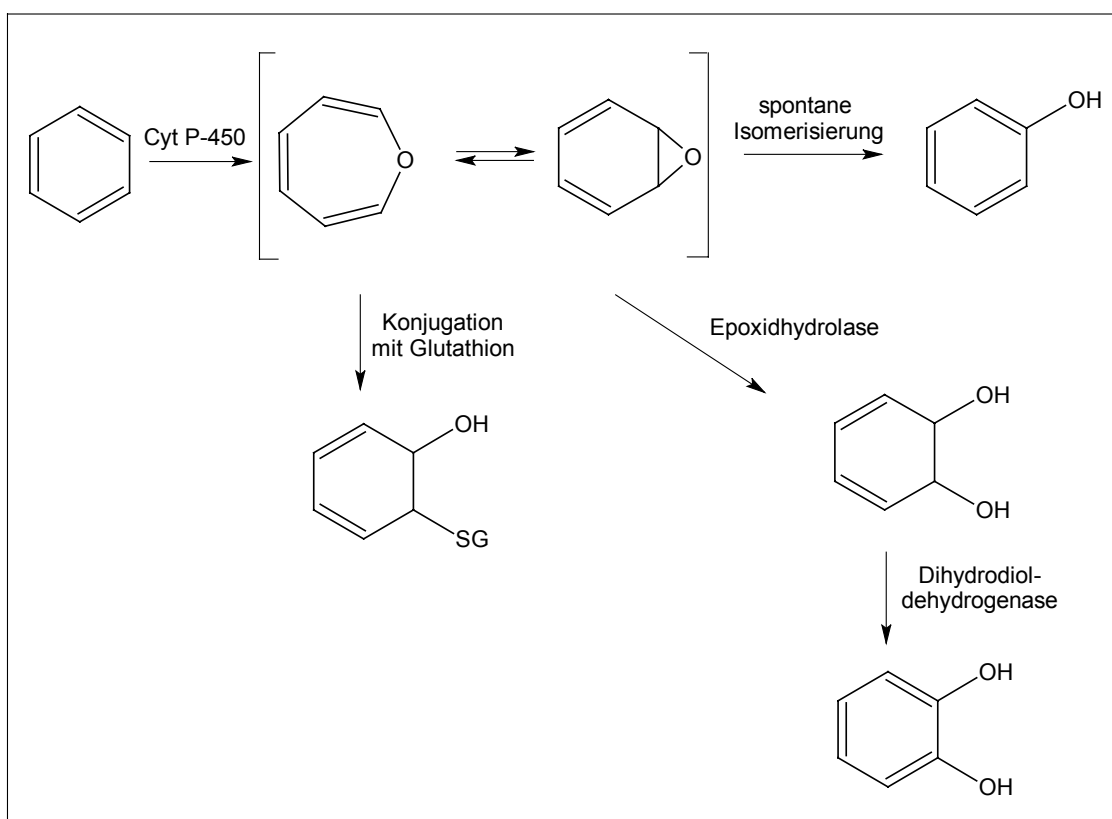


Schema 20: Konkurrenzreaktion zum NIH-Shift (B: Base)

Bei Biotransformationsuntersuchungen sind Arenoxide bisher direkt für polycyclische Aromaten nachgewiesen worden, z. B. das 1,2-Naphthalenepoxid [82]. Der Nachweis für Phenylarenoxide erfolgte aufgrund ihrer Instabilität nur indirekt [83, 84]. Es gibt jedoch verschiedene Kriterien, die bei einer C-Oxygenierung auf einen Mechanismus über Arenoxide deuten: die Bildung phenolischer Metabolite, das Auftreten von Glutathionkonjugaten bzw. von Mercaptursäurekonjugaten im Urin, die Bildung von *trans*-Dihydrodiolen und den daraus entstehenden Catecholstrukturen und ihren Konjugaten. Catechole werden bevorzugt aus Dihydrodiolen und weniger durch aufeinanderfolgende Hydroxylierung am aromatischen System gebildet [81]. Auch bei den innerhalb dieser Arbeit durchgeführten Biotransformationsuntersuchungen treten Catecholabkömmlinge, allerdings erst nach Methylkonjugation, auf und lassen damit eine über den Arenoxid-Mechanismus erfolgte Hydroxylierung sehr wahrscheinlich

erscheinen.

Welcher der möglichen Reaktionswege jedoch hauptsächlich beschriftet wird, hängt stark von den elektronischen Verhältnissen in den Molekülen selbst ab. Elektronenziehende Substituenten stabilisieren Arenoxide und führen zu einer vermehrten Bildung von Dihydrodiolen und Glutathionkonjugaten, z. B. bei Halogenbenzen. Auch polycyclische Aromaten stabilisieren die Arenoxide. Im Gegensatz dazu führen sehr instabile Arenoxide hauptsächlich zu phenolischen Derivaten [70]. Das erklärt, warum bei den vier in dieser Arbeit untersuchten Substanzen keine Dihydrodiolbildung beobachtet werden konnte. Sowohl das zentrale Kohlenstoffatom als auch die Methoxygruppen haben als Substituenten erster Ordnung keinen stabilisierenden Effekt auf Arenoxide. In Schema 21 sind die verschiedenen Reaktionsmöglichkeiten bei der Biotransformation von Benzen über den Arenoxidmechanismus dargestellt. Als ein weiteres mögliches monooxygeniertes Zwischenprodukt ist das Oxepin berücksichtigt [81].



Schema 21: Reaktionswege bei der Cyt P-450 vermittelten Oxygenierung von Benzen  
Substituenten erster Ordnung dirigieren bevorzugt in *p*- und *o*-Stellung an den Phenylringen. Das zentrale C-Atom bei den untersuchten Benzilsäurederivaten kann

formal als Alkylsubstituent betrachtet werden. Die *o*-Position ist bei den Benzilaten jedoch sterisch abgeschirmt und somit weniger reaktiv und angreifbar als die *p*-Position. Dies könnte eine Ursache für die Bildung der *p*-Hydroxyverbindungen sein. Einen weiteren Einfluss auf die Stellung der phenolischen Gruppierung im Molekül könnten außerdem sogenannte „bond orders“ haben, die ein Ausdruck für den Mehrfachbindungscharakter einer Bindung sind. Sie liegen zwischen 0 für eine Einfachbindung und 1 für eine Doppelbindung [70]. Da Monooxygenasen als leicht elektrophiles Agens agieren, findet die Arenoxidbildung bevorzugt an Bindungen mit größeren bond orders statt. Dies wurde für Naphthalen nachgewiesen [70].

Benzophenone entstehen durch Decarboxylierung der entsprechenden Benzilsäuren. Decarboxylierungen selbst spielen auch im Stoffwechsel des Körpers eine wichtige Rolle. So gehen biogene Amine aus Aminosäuren durch nichtoxidative Abspaltung von Kohlendioxid hervor. Die oxidative Decarboxylierung von  $\alpha$ -Ketosäuren führt zur jeweils niedrigeren Carbonsäure und Kohlendioxid. Bei der Decarboxylierung der Benzilsäuren entstehen zunächst als Zwischenprodukte Benzhydrole. Diese werden durch unspezifische Dehydrogenasen zu den Benzophenonen oxidiert. Auch bei der Biotransformation verschiedener Benzhydrolether sind Benzophenone als Metabolite beobachtet worden, z. B. bei Diphenhydramin [85] und Bromazin [86].

Die Methylierung von Phenolen stellt eine Phase-II-Reaktion dar. Im Unterschied zu anderen Phase-II-Reaktionen führt diese jedoch nicht zu so deutlichen Löslichkeitsveränderungen der Substrate. Als Coenzym fungiert S-Adenosylmethionin und als Überträger werden Methyltransferasen aktiv. Größere Bedeutung kommt der COMT (Catechol-*O*-Methyltransferase) bei der Metabolisierung von Catecholaminen zu. Sie katalysiert Monomethylierungen von *o*-Diphenolen. Dabei erfolgt die *O*-Methylierung substituierter 3,4-Dihydroxyphenylverbindungen vorrangig in *m*-Position. Es gibt aber auch genügend Beispiele für eine in *p*-Stellung ablaufende Methylierung [87]. *O*-Methylierungen sind stark von den im Molekül gebundenen Gruppen abhängig, z. B. führen ionisierte Gruppen zu einem starken Übergewicht der *m*-*O*-Methylierung [88]. Solche Methylierungsreaktionen haben auch bei den untersuchten Benzilaten stattgefunden. Bei der Biotransformation von **1** und **2** sind am vorher unsubstituierten aromatischen Ring sowohl eine zusätzliche Hydroxy- als auch Methoxygruppierung nachgewiesen worden. Über ein Arenoxid könnten sich die Diphenole gebildet haben, die durch die COMT zu den isolierten Metaboliten abgebaut

wurden.

Bei den Untersuchungen treten weitere Phase-II-Reaktionen in Form der Konjugation mit Glucuronsäure und/oder Schwefelsäure auf. Eine Differenzierung zwischen diesen beiden Phase-II-Reaktionen wurde nicht durchgeführt. Bei der Konjugation mit Glucuronsäure muss diese im Organismus zunächst aktiviert werden. Dabei wird aus  $\alpha$ -D-Glucose-1-phosphat und UTP mit Hilfe einer Phosphorylase und nachfolgender Oxidation durch eine Dehydrogenase zunächst das Cosubstrat Uridin-5'-diphospho- $\alpha$ -D-glucuronsäure (UDPG) gebildet. Die Übertragung dieser aktivierten Glucuronsäure erfolgt mit Hilfe von UDP-Glucuronosyltransferasen z. B. auf Alkohole, Phenole, Säuren und Amine [89, 90].

Auch bei der Konjugation mit Schwefelsäure erfolgt zunächst eine Aktivierung des Substrates. Dabei wird aus organischem Sulfat durch eine ATP-Sulfurylase das Adenosin-5'-phosphat (APS) gebildet, welches durch die APS-Phosphokinase zum Cosubstrat 3'-Phospho-adenosin-5'-phosphosulfat phosphoryliert wird. Durch Sulfotransferasen wird Sulfat auf ein Substrat, z. B. auf Alkohole und Phenole, unter Freisetzung von 3'-Phospho-adenosin-5'-phosphat übertragen [89, 90].

Häufig reagieren die Sulfo- und Glucuronosyltransferasen mit denselben Substraten und konkurrieren um sie. Dabei stellt die Glucuronidierung eine low-affinity/high-capacity- und die Sulfatkojugation umgekehrt eine high-affinity/low-capacity-Konjugation dar [91]. Die genauen Substitutionsstellen wurden bei den hier durchgeführten Biotransformationsstudien der Benzilate nicht untersucht.

## **4.2 Vergleich der Biotransformation der untersuchten Benzilsäureester**

In Tab. 14 sind die Wichtungen der verschiedenen Abbauewege bei der Metabolisierung der Verbindungen **1**, **2**, **3** und **4** übersichtsweise und zusammengefasst dargestellt. Die Aussagen beziehen sich auf die Auswertungen der HPLC und DC, die gewisse quantitative Einschätzungen zulassen.

Die vier untersuchten Benzilsäureester unterliegen im Organismus der Ratte umfangreichen Veränderungen. In allen Fällen kann ein Teil der Ausgangsverbindung wiedergefunden werden, allerdings scheint diese Wiederfindungsrate Tendenzen aufzuweisen. So wurden die 3,3'-Dimethoxyderivate **3** und **4** im Gegensatz zu den entsprechenden 3,4-Dimethoxyisomeren **1** und **2** in geringeren Mengen wieder-

gefunden. Auch innerhalb des gleichen aromatischen Substitutionsmuster gibt es Unterschiede. Die N-Methyl-3-piperidinylderivate werden stärker verstoffwechselt als ihre N-Methyl-4-piperidinylderivate. Daraus ergibt sich folgende Reihe, die die Wiederfindung und damit Stoffwechselstabilität der Ausgangssubstanzen charakterisiert: 1 > 2 > 3 > 4.

Tab. 14: Bedeutungen der metabolischen Abbaureaktionen bei der Biotransformation von 1, 2, 3 und 4

Metabolische Reaktion	Verbindung			
	<u>1</u>	<u>2</u>	<u>3</u>	<u>4</u>
Esterspaltung	++	+++ (+)	++++	+++++
Aromatische C-Oxygenierung	+++++	++++	+++	+
O-Dealkylierung	++	++	+++	+++++
N-Dealkylierung	+++	+++	++	++
Lactamisierung	+	+	+	+
N-Oxidation	++	-	-	-
Oxidation zum Benzophenon	+++	+++	+++	+++
Methylierung	++	++	+	+
Konjugation	+	+	+	(+)

- keine Umsetzung, + sehr geringe Umsetzungsrate, ++ geringe Umsetzungsrate, +++ mittlere Umsetzungsrate, ++++ hohe Umsetzungsrate, +++++ sehr hohe Umsetzungsrate

Große Unterschiede ergeben sich in den Hauptbiotransformationswegen. Ist bei der Metabolisierung von 1 die aromatische Hydroxylierung dominant und stellen allgemein die Ester die Hauptmenge an Metaboliten, so lässt die Substanzmenge an Benzophenonen schon auf eine hohe Esteraseaktivität schließen. Es zeigt sich bei der Metabolisierung von 2, dass die Hydroxylierung auch hier einen wichtigen Metabolisierungsweg darstellt. Den Hauptmetaboliten selbst bildet jedoch die einfache, am zuvor unsubstituierten Ring, hydroxylierte Benzilsäure. Anscheinend führt die Veresterung mit dem N-Methyl-3-piperidinol zu weniger esterastabilen Benzilsäurederivaten. Dies kann bei Vergleich der Biotransformationen von 3 und 4

bestätigt werden, wo letztere Verbindung eine wesentlich geringere Estermetabolitenmenge aufweist. Im Vergleich scheinen auch die 3,4-Dimethoxyderivate eine höhere Stabilität gegenüber esteratischen Angriffen zu haben als die 3,3'-Dimethoxyisomeren. Die 3,3'-Dimethoxyderivate weisen als einen Hauptmetabolisierungsweg die O-Dealkylierung auf, während **1** und **2** wie oben erwähnt starken Veränderungen durch C-Oxygenierung unterliegen. Die 3-Methoxy-substitution in einem Phenylring scheint die Aktivität für C-Oxygenierungen am Aromaten zu senken und die zur Etherspaltung zu erhöhen. Dies könnte an einer sterischen Abschirmung des aromatischen Ringes durch die Methoxyfunktion und einer besseren Angreifbarkeit dieser durch Cyt P-450 liegen. Bei Verbindung **3** besitzen O-Dealkylierung und Hydroxylierung ähnliche Bedeutung. Bei der Biotransformation vom Benzilat **4** stellt neben der Esterspaltung die O-Dealkylierung der aromatischen Etherfunktionen den Hauptmetabolisierungsweg dar. Die C-Oxygenierungsreaktion ist stark zurückgedrängt. Ob das N-Methyl-3-piperidinylisomer allgemein eine größere Tendenz zur O-Dealkylierung besitzt als das N-Methyl-4-piperidinylderivat, kann bei den Substanzen **1** und **2** nicht bestätigt werden. Allerdings ist es bei diesen Verbindungen schwierig, bedingt durch das starke Übergewicht der Hydroxylierungsreaktion gegenüber der Etherspaltung, eine grundlegende Einschätzung zu treffen.

Einen weiteren wichtigen Metabolisierungsweg stellt bei allen vier Substanzen die N-Dealkylierung dar. Die Verhältnisse der unterschiedlich aromatisch substituierten N-demethylierten Derivate entsprechen annähernd denen der N-methylierten Ester. Diese sind mengenmäßig den dealkylierten Produkten jedoch immer überlegen.

Estermetabolite mit nur einer Strukturänderung gegenüber der Ausgangsverbindung treten quantitativ stärker auf als mehrfach veränderte Produkte. So bereitete es aufgrund geringer Substanzmengen häufig Schwierigkeiten, Metabolite, die sowohl hydroxyliert und am N und/oder O dealkyliert waren, zu identifizieren.

Die Bildung von N-Oxiden ist nur bei Verbindung **1** beobachtet worden. Dies muss jedoch kein Indiz für die Nicht-Bildung sein, da diese Verbindungen im Körper weiterreagieren können (vgl. 4.1).

Bei den Metabolisierungsuntersuchungen konnten Lactame nachgewiesen werden - bei **4** jedoch nicht das Lactam der Ausgangsverbindung sondern das des einfach O-dealkylierten Esters. Die O-Dealkylierungen stellt hier, wie oben beschrieben, den

Hauptmetabolisierungsweg am aromatischen System dar.

Zu den auffälligen Metaboliten gehören die vierfach substituierten Benzilsäurederivate. Besonders bei den Verbindungen **1** und **2** lässt ihr Auftreten auf einen Arenoxid-Mechanismus mit nachfolgender Umwandlung zu Catecholstrukturen schließen (vgl. 4.1). Die Bildung von zwei zusätzlichen Substitutionsstellen am Aromaten bei Biotransformationsuntersuchungen scheint in der Ratte nichts Ungewöhnliches zu sein und tritt in vielen Studien, u. a. bei verschiedenen Diphenylmethanen, auf [92, 93, 94]. Auch beim Menschen sind solche Aktivitäten bekannt [95].

Die Biotransformation zu Benzophenonen ist von der Rate der Esterhydrolyse zu Benzilsäuren abhängig, aus denen sie metabolisiert werden. Die Tendenz zur Benzophenonbildung scheint nicht in Abhängigkeit vom Substitutionsmuster der Aromaten aufzutreten und kommt bei allen Untersuchungen in ähnlichem Maße vor.

Phase-II-Metabolite konnten bei allen vier Metabolismusstudien nachgewiesen werden. Sie treten jedoch nur in geringen Mengen auf. Es handelt sich ausnahmslos um phenolische Derivate.

Über den Kot wird eine große Metabolitenmenge an Benzilsäureestern und Benzophenonen ausgeschieden. Benzilsäuren werden jedoch nicht mit der Faeces exkretiert. Ihre Ausscheidung erfolgt ausschließlich über den Urin.

Bei der Auswertung der Metabolitenextrakte wird nebenbei ein chemischer Aspekt auffällig. N-Methyl-3-piperidinylester unterliegen leichter Umesterungen als ihre N-Methyl-4-piperidylisomere. Sowohl bei der Biotransformation von **2** als auch **4** können Methylester als Artefakte, vermutlich bedingt durch die Aufarbeitung, bestimmt werden. Solche Reaktionen wurden bei **1** und **3** nicht beobachtet.

### **4.3 Vergleich der Biotransformation mit verwandten Benzilaten**

Die bei der Metabolisierung von **1**, **2**, **3** und **4** aufgetretenen Metabolisierungswege wurden bereits auch bei anderen Benzilatstudien beschrieben (vgl. 2). Es gibt allerdings kein Derivat, bei dem die Veränderungen während der Körperpassage so vielfältig waren wie bei den hier untersuchten Benzilsäureestern und alle geschilderten Reaktionen simultan auftraten.

Einen Hauptmetabolisierungsweg stellt die Esterspaltung (bzw. Amidspaltung) dar. Sie scheint ein allgemeiner Abbauweg der Benzilate zu sein. Einschätzungen der



Esteraseaktivität in Abhängigkeit der Struktur (vgl. 4.2) können aufgrund fehlender Konzentrationsangaben, verschiedener Modellsysteme und Strukturen hier nicht getroffen werden.

Die aromatische Oxigenierung tritt nur in der Ratte auf. Beim Menschen kommt es zu nichtaromatischen C-Oxigenierungen bei Seitenkettenveretherung der alkoholischen Hydroxylgruppe. Hydroxy-Methoxy-Substitution an einem vorher unsubstituierten Phenylring wurden nur im Falle von Epicainid in der Ratte beobachtet [22].

N-Dealkylierungen treten sowohl bei der Ratte als auch im Menschen häufig auf. O-Dealkylierungen werden bei Benzilaten unabhängig von der verwendeten Tierspezies beobachtet. Beim Menschen sind solche Untersuchungen nur hinsichtlich der O-Dealkylierungen bei Seitenkettenveretherung der alkoholischen Funktion durchgeführt worden. Jedoch werden auch bei Nichtbenzilaten O-Dealkylierungen von aromatischen Methoxyfunktionen beschrieben [96, 97].

N-Oxide werden bei Biotransformationsuntersuchungen an Benzilaten sowohl in der Ratte als auch im Menschen nachgewiesen.

Die Lactambildung ist bisher nur beim Menschen an dem Benzilsäureamid Epicainid am Pyrrolidinring beobachtet worden [22]. Es konnte bei den hier durchgeführten Untersuchungen erstmals der Nachweis der Lactamisierung für Benzilsäurederivate in der Ratte geführt werden.

Benzophenonbildung scheint ein typischer Abbauweg für Benzilate in der Ratte zu sein und konnte im Menschen bisher nicht nachgewiesen werden.

Auf Konjugate wurde anderweitig selten geprüft. Wurden Glucuronide und Sulfatkonjugate nachgewiesen, so handelte es sich wie bei diesen Untersuchungen ausschließlich um phenolische Derivate.

#### **4.4 Vergleich der Biotransformation von Benzilaten mit ihrer biomimetischen Umsetzung**

(vgl. 2)

Ein Vergleich der Biotransformation mit der biomimetischen Umsetzung zeigt Übereinstimmung in einigen Funktionalisierungsreaktionen des Körpers. In Tab. 15 sind die metabolischen Veränderungen, die die Verbindungen **1**, **2** und **3** während der Körperpassage in der Ratte erfahren haben, im Vergleich zu den Ergebnissen der

biomimetischen Umsetzung dargestellt.

Tab. 15: Vergleich der Metabolisierung und biomimetischen Umsetzung von **1**, **2** und **3**

Reaktion	<b>1</b>		<b>2</b>		<b>3</b>	
	Ratte	Biom.	Ratte	Biom.	Ratte	Biom.
Esterspaltung	+	+	+	+	+	+
Aromatische C-Oxygenierung	+	-	+	-	+	-
O-Dealkylierung	+	-	+	-	+	-
N-Dealkylierung	+	+	+	+	+	+
Lactamisierung	+	-	+	-	+	-
N-Oxidation	+	+	-	+	-	+
Oxidation zum Benzophenon	+	+	+	+	+	+
Phenol-methylierung	+	-	+	-	-	-
Methylester-bildung	-	+	(+) <sup>1</sup>	+	-	+
Konjugation	+	-	+	-	+	-
N-Formylierung	-	+	-	+	-	+

Biom. – Biomimetik; + Reaktion; - keine Reaktion; <sup>1</sup> keine metabolische Reaktion (Artefakt)

Die N-Dealkylierung, die Esterspaltung zu den Benzilsäuren und die nachfolgende Oxidation zu Benzophenonen stellen gemeinsame Abbauege dar.

Der für die biomimetische Umsetzung von **1** nachgewiesene Weg der oxidativen Esterspaltung kann, aufgrund des Fehlens des dabei entstehenden N-Methyl-4-piperidon, bei der Biotransformation nicht bestätigt werden.

Auf biomimetischem Wege können die N-Oxide aller drei Verbindungen dargestellt werden. Dies steht jedoch nicht im Einklang mit den Ergebnissen der Biotransformation, wo nur der Nachweis vom N-Oxid von **1** erfolgte.

Bei den biomimetischen Untersuchungen konnten keine O-dealkylierten Derivate und

Lactame nachgewiesen werden. Aromatische C-Oxygenierungen in *p*-Stellung finden nicht statt. Es wird nur ein C-oxygeniertes Benzophenon in *o*-Stellung des substituierten Aromaten gebildet. Zusätzlich wurden dagegen N-Formylprodukte identifiziert.

Bei vier weiteren Benzilsäurederivaten ist die Biotransformation mit der biomimetischen Umsetzung verglichen worden (vgl. 2). Auch bei diesen Umsetzungen erfolgte die Simulierung der Funktionalisierungsreaktionen Esterspaltung, N-Dealkylierung, Benzophenon- und N-Oxidbildung. Bei Propiverin und 1-Methyl-4-piperidyl benzilat konnten C-oxygenierte Produkte des Benzophenons und der Benzilsäure isoliert werden. Ebenfalls entsteht bei der Umsetzung von 1-Methyl-4-piperidyl 4-methoxybenzilat ein in 3-Stellung hydroxyliertes Derivat. Die C-Oxygenierung an einem unsubstituierten aromatischen Phenylring eines Benzilsäureesters gelang bisher jedoch nicht.

Die O-Dealkylierung mittels biomimetischer Systeme ist bei anderen Untersuchungen nachgewiesen worden. So erfolgte diese für aromatische Methoxygruppen am Beispiel von 1-Methyl-4-piperidyl 4-methoxybenzilat. Substitutionen mit einer 3,4-Dimethoxystruktur bzw. 3-Methoxygruppierung scheinen dagegen, den Ergebnissen der biomimetischen Umsetzung von **1**, **2** und **3** zufolge, die Etherstruktur zu stabilisieren und die Reaktivität zu senken.

Die Lactamisierung konnte bisher bei keiner biomimetischen Umsetzung von Benzilaten nachgewiesen werden.

Sulfat- bzw. Glucuronsäurekonjugationen sind von den biomimetischen Systemen ausgehend nicht möglich.

Die Simulierung von Esterspaltungen, N-Dealkylierungen, N-Oxid- und Benzophenonbildungen scheint in biomimetische Systemen bei der Umsetzung von Benzilsäurederivaten keine Schwierigkeiten zu bereiten. Schwieriger gestaltet es sich dagegen, mögliche Abläufe und das Substitutionsmuster der C-Oxygenierungsreaktionen nachzustellen. Es werden keine unsubstituierten Phenylringe der Ester oxigeniert. Ebenso erfolgen O-Dealkylierungen nur bei einfachen Strukturen. Einige Reaktionen, wie z. B. die Lactambildung, sind mit den bisherigen Systemen nicht zu simulieren.

Der Biomimetik gelingt es, wichtige Reaktionen der Biotransformation nachzustellen. Eine Simulierung aller Abbauschritte ist jedoch nicht möglich und kann nicht erwartet werden. Diese Methode ist jedoch gut geeignet, eventuelle Metabolite als Vergleichssubstanzen zur Verfügung zu stellen, die sonst nur schwer zugänglich wären.

## 4.5 Metabolisierung und Wirksamkeit

Aufgrund der von VORWERK [3] abgeleiteten Struktur-Aktivitätsbeziehungen für Benzilate an Membranpräparationen von stabil transfizierten Chinese-hamster-ovary-Zellen mit humanen Muskarinrezeptorsubtypen lassen sich die pharmakologischen Wirksamkeiten hinsichtlich einer Antiparkinsonaktivität der Metabolite grob einschätzen. Die hier gezogenen Schlüsse beziehen sich jedoch nur auf die antimuskarinerge Rezeptoraffinität und nicht auf dopaminerge Wirkungen, da für letztere solche Aussagen aufgrund fehlender Zusammenhänge nicht getätigt werden können.

Generell kann den vorliegenden basischen Estern eine anticholinerge Wirksamkeit zugesprochen werden, wobei die Affinität zum Muskarinrezeptor bei Zunahme der Substitution am aromatischen System abnimmt. Bei einer recht hohen Esterspaltungsrate, wie sie bei **3** und besonders **4** auftritt, ist mit einer schnellen Wirkungsabnahme zu rechnen. Bei **1** und **2** ist die aromatische Hydroxylierung in *p*-Position dominant. Für diese Substitutionstellung wird eine Zunahme an antimuskarinerger Wirksamkeit durch eine mögliche zusätzliche Bindungsstelle am Rezeptor diskutiert. Bei der Metabolisierung zu vierfach substituierten Benzilaten wird dagegen eine abgeschwächte Beziehung zu den aktiven Zentren im Rezeptor aufgrund Volumenzunahme der Substituenten vermutet. Auch die Verwendung des Aminoalkohols hat Einfluss auf die Affinität zu den Muskarinrezeptoren. So besitzen Ester des N-Methyl-4-piperidinols (Substanzen **1** und **3** und deren Metabolite) größere anticholinerge Aktivität als die entsprechenden N-Methyl-3-piperidylester (Substanzen **2** und **4** und deren Metabolite).

Ein direkter Vergleich der Wirksamkeit der vier Verbindungen ist aufgrund von verschiedenen Wirkungsstärken und -längen mit den bisherigen Untersuchungen nicht möglich. So besitzt **3** wegen des geringeren Substituentenvolumens eine größere Affinität als **1** zu den M-Rezeptoren, wird allerdings schneller esteratisch gespalten. Für weitere und bessere Aussagen wären pharmakologische Testungen am Ganztier notwendig.

## 5 Experimenteller Teil

### 5.1 Geräte

- HPLC: analytisch: HP 1090 M Series II (Hewlett Packard) mit DAD  
präparativ: Merck Hitachi HPLC-System mit L-4000 UV Detektor,  
D-6000 Interface, L-6200A Intelligent Pump
- MS: MS 5995 (Hewlett Packard) mit Direkteinlasssystem, Elektronen-  
energie 70 eV
- GC-MS: GC 5890 Serie II (Hewlett Packard), MS 5989 B (Hewlett Packard)
- NMR: DPX 300 NMR-Spektrometer (Bruker)
- Heiztischmikroskop Thermogalen GA-D-4/89 (Leica)
- Vakuumrotationsverdampfer Rotavapor R 111 (Büchi)
- Ultraschallbad Sonorex RK 100 (Bandelin)
- Magnetrührer RCT basic (IKA Labortechnik)
- Kontaktthermometer ETS-D4 fuzzy (IKA<sup>®</sup> Werke)
- Membran-Vakuumpumpe TYP N 726.3FT.18 (KFN Neuberger GmbH)
- UV-Lampe Nr. 022.9230, Leistung 8 W (Camag)
- Heizplatte 0 – 250 °C (Gerhardt)
- pH-Messgerät WTW pH 522 (Wissenschaftlich-Technische Werkstätten), mit  
Glaselektrode N 6280 (SCHOTT Geräte)
- Lyophilisator CHRIST ALPHA 1-4 (Medizinischer Apparatebau CHRIST) mit  
Ölpumpe DUO 004 B (Pfeiffer)
- Tiefkühlschrank (-20 °C) (FORON)
- Tiefkühlschrank GFL (-85 °C) (ATEX)
- Kühlschrank LABEX-280 (6 °C) (Kirsch)

## 5.2 Chemikalien und Vergleichssubstanzen

### 5.2.1 Chemikalien und kommerziell erworbene Vergleichssubstanzen

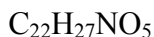
Aceton (Merck), Acetonitril gradient grade (Merck), Amberlite® XAD-2 (VEB Chemiekombinat Bitterfeld), Ammoniak-Lösung (33 %) (Ferak), Ammoniumacetat (Laborchemie Apolda), Ammoniumchlorid (Laborchemie Apolda), basisches Bismutoxidnitrat (Fluka), Chloroform (Baker), Cyclohexan (Ferak), Deuteriochloroform  $\geq 99,5$  % (Merck), Dichlormethan (Merck), Diethylether (Baker), 3,4-Dimethoxybenzoesäure (Merck), Dimethylformamid (Ferak), Dimethylsulfat (Merck), Dioxan (Laborchemie Apolda), Essigsäure 100 % (Merck), Essigsäureethylester (Aldrich), Ethanol (Baker), Extrelut® (Merck),  $\beta$ -Glucuronidase (30 U/ml)/Arylsulfatase (60 U/ml) (Merck), 3-Hydroxy-N-methylpiperidin 98 % (Aldrich), 4-Hydroxy-N-methylpiperidin 98 % (Aldrich), Isopropanol (Merck), Isovanillinsäure (ICN Biomedicals Inc.), Kaliumdihydrogenphosphat-Dihydrat (Laborchemie Apolda), Kaliumhexacyanoferrat(III) (Laborchemie Apolda), Kaliumiodid (Merck), Kaliumpermanganat (Merck), Methanol (Baker), Methanol gradient grade (Merck), 3-Methoxybenzoesäure (Merck), 3-Methyl-2-benzothiazolinonhydrazon (MBTH) (Aldrich), Natrium (Merck), Natriumcarbonat (Merck), Natriumchlorid (Merck), Natrium-EDTA (isocommerz), Natriumhydrogencarbonat (Merck), Natriumhydroxid (Chemapol), Natriumsulfat wasserfrei (Riedel-de-Haën), Perchlorsäure 70 % (Ferak), Petroleumbenzin 60 – 80 °C (Baker), Phenolphthalein (Merck), 3-Piperidinol (Fluka), 4-Piperidinol (Fluka), Quecksilber-II-acetat (VK Labor- und Feinchemikalien), Salzsäure 36 % (Baker), Schwefelsäure 95 - 97 % (Merck), Stickstoff (Air Liquide GmbH), Toluol (Merck), Vanillinsäure (ICN Biomedicals Inc.)

## 5.2.2 Synthetisierte Vergleichssubstanzen

### 5.2.2.1 (R,S)-N-Methyl-4-piperidyl 3,4-dimethoxybenzilat (**1**) und verwandte Verbindungen

#### (R,S)-N-Methyl-4-piperidyl 3,4-dimethoxybenzilat (**1**)

Die Synthese und Struktursicherung erfolgten in der Arbeitsgruppe Pharmazeutische Chemie (Prof. Dr. Göber) am Institut für Pharmazie der HUB [3].



$M_r = 385,4 \text{ g/mol}$

F<sub>P</sub>: 108 – 110 °C (Diethylether)

HPLC: R<sub>T</sub> = 10,7 min (Methode I)

DC: FM I: R<sub>F</sub> = 0,46

FM II: R<sub>F</sub> = 0,85

Detektion: A, B (Raumtemperatur braun, Heizplatte hellblau), C (orange)

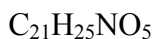
EI-MS: m/z (I<sub>rel.</sub> in %): M<sup>+</sup> 385 (2), 243 (32), 165 (5), 137 (3), 105 (100), 99 (34), 98 (18), 97 (5), 96 (12), 77 (16)

<sup>1</sup>H-NMR: δ [ppm]: 1,66 und 1,81 (4H, CH<sub>2</sub>); 2,11 (3H, N-CH<sub>3</sub>); 2,15 und 2,25 (4H, N-CH<sub>2</sub>); 3,74 und 3,81 (je 3H, OCH<sub>3</sub>); 4,27 (1H, OH); 4,91 (1H, CH); 6,75 (1H, Ar-H, C-5); 6,89 und 6,93 (2H, Ar-H, C-2, C-6); 7,20 - 7,37 (5H, Ar-H)

<sup>13</sup>C-NMR: δ [ppm]: 30,4 (CH<sub>2</sub>); 46,1 (N-CH<sub>3</sub>); 52,1 (N-CH<sub>2</sub>); 55,8 und 55,9 (OCH<sub>3</sub>); 80,7 (C<sup>\*</sup>); 84,5 (CH); 110,2 (Ar-C-5); 110,7 (Ar-C-2); 119,9 (Ar-C-6); 127,4 (2 Ar-m-C); 127,9 (2 Ar-o-C); 128,0 (Ar-p-C); 134,4 (Ar-C); 142,2 (Ar-C-1); 148,5 (Ar-C-4); 148,7 (Ar-C-3); 174,0 (C=O)

#### (R,S)-N-Methyl-4-piperidyl 4-hydroxy-3-methoxybenzilat (**5**)

Die Substanz erschien als Abbauprodukt bei Stabilitätsuntersuchungen und wurde von VORWERK strukturaufgeklärt [3].



$M_r = 371,4 \text{ g/mol}$

HPLC: R<sub>T</sub> = 6,5 min (Methode I)

DC: FM I: R<sub>F</sub> = 0,44

FM II: R<sub>F</sub> = 0,75

Detektion: A, B (Raumtemperatur braun, Heizplatte hellblau), C (orange),  
D (dunkelrot)

EI-MS:  $m/z$  ( $I_{\text{rel.}}$  in %):  $M^+$  371 (1), 229 (37), 151 (9), 123 (3), 105 (100), 99 (27),  
98 (18), 97 (4), 96 (14), 77 (19)

### **(R,S)-4-Piperidyl 3,4-dimethoxybenzilat (8)**

Die Synthese und Struktursicherung erfolgten in der Arbeitsgruppe Pharmazeutische Chemie (Prof. Dr. Göber) am Institut für Pharmazie der HUB [3].

$C_{21}H_{25}NO_5$

$M_r = 371,4$  g/mol

$F_P$ : 160 °C (Chloroform/Diethylether)

HPLC:  $R_T = 10,0$  min (Methode I)

DC: FM I:  $R_F = 0,41$

FM II:  $R_F = 0,66$

Detektion: A, B (Raumtemperatur braun, Heizplatte hellblau), C (orange)

EI-MS:  $m/z$  ( $I_{\text{rel.}}$  in %):  $M^+$  371 (2), 243 (54), 165 (6), 137 (1), 105 (100), 85 (23),  
84 (12), 83 (1), 82 (6), 77 (21)

NMR: s. [3, 4]

### **(R,S)-N-Methyl-4-piperidyl 3,4-dimethoxybenzilat N-oxid (12) (beide Isomere)**

Die Synthese und Struktursicherung erfolgten in der Arbeitsgruppe Pharmazeutische Chemie (Prof. Dr. Göber) am Institut für Pharmazie der HUB [4].

$C_{22}H_{27}NO_6$

$M_r = 401,4$  g/mol

HPLC:  $R_T = 11,7$  und  $12,1$  min (Methode I)

DC: FM I:  $R_F = 0,20$  und  $0,36$

FM II:  $R_F = 0,25$  und  $0,36$

Detektion: A, B (Raumtemperatur braun, Heizplatte hellblau), C (orange)

EI-MS:  $m/z$  ( $I_{\text{rel.}}$  in %): kein  $M^+$ , 385 (1), 243 (26), 165 (30), 137 (4), 105 (100), 99  
(23), 98 (14), 97 (3), 96 (10), 77 (36)

NMR: s. [4]



### **(R,S)-N-Methyl-2-oxo-4-piperidyl 3,4-dimethoxybenzilat (13)**

0,60 g Kaliumpermanganat und 0,50 g Natriumcarbonat werden unter Eiskühlung in 30 ml Wasser gerührt. Dazu werden 0,50 g 1-HCl gegeben und bis zum Verschwinden der Violettfärbung gerührt. Der Braunstein wird abfiltriert und die Lösung dreimal mit je 20 ml Ether extrahiert. Die Etherphase wird darauf dreimal mit je 20 ml 2 % Salzsäure ausgeschüttelt und im Vakuum eingeeengt.

Ausbeute: 3 % (der Theorie)

$C_{22}H_{25}NO_6$

$M_r = 399,4$  g/mol

gelbes Öl

HPLC:  $R_T = 7,1$  min (Methode I)

DC: FM I:  $R_F = 0,50$

FM II:  $R_F = 0,80$

Detektion: A, B (Raumtemperatur braun, Heizplatte hellblau), C (orange)

EI-MS: m/z ( $I_{rel.}$  in %):  $M^+$  399 (1), 243 (27), 165 (30), 137 (11), 113 (13); 105 (100), 77 (51), 55 (10), 51 (15), 44 (17)

GC-MS:  $R_T = 17,2$  min

$^1H$ -NMR:  $\delta$  [ppm]: 1,92 (2H, N-CO-CH $\underline{2}$ ); 2,44 und 2,63 (2H, N-CH $\underline{2}$ -CH $\underline{2}$ ); 2,74 (3H, N-CH $\underline{3}$ ); 3,00 und 3,39 (2H, N-CH $\underline{2}$ ); 3,72 und 3,81 (je 3H, OCH $\underline{3}$ ); 5,25 (1H, CH); 5,84 (1H, OH); 6,76 (1H, Ar-H, C-5); 6,87 und 6,91 (2H, Ar-H, C-2, C-6); 7,20 - 7,33 (5H, Ar-H)

$^{13}C$ -NMR:  $\delta$  [ppm]: 26,7 (N-CH $\underline{2}$ -CH $\underline{2}$ ); 34,3 (N-CH $\underline{3}$ ); 36,9 (N-CH $\underline{2}$ ); 44,70 (N-CO-CH $\underline{2}$ ); 55,9 (OCH $\underline{3}$ ); 70,1 (CH); 80,7 (C $\underline{*}$ ); 110,2 (Ar-C-5); 110,7 (Ar-C-2); 119,9 (Ar-C-6); 127,1 (2 Ar- $\underline{m}$ -C); 127,1 (2 Ar- $\underline{o}$ -C); 128,3 (Ar- $\underline{p}$ -C); 133,9 (Ar-C); 141,8 (Ar-C-1); 148,8 (Ar-C-4); 148,9 (Ar-C-3); 166,4 (N-C=O); 173,8 (C=O)

### **(R,S)-3,4-Dimethoxybenzilsäure (16)**

Die Synthese und Struktursicherung erfolgten in der Arbeitsgruppe Pharmazeutische Chemie (Prof. Dr. Göber) am Institut für Pharmazie der HUB [3].

$C_{16}H_{16}O_5$

$M_r = 288,3$  g/mol

$F_p$ : 92-96 °C (Wasser)

HPLC:  $R_T = 9,5$  min (Methode I)  
 DC: FM I:  $R_F = 0,22$   
 FM II:  $R_F = 0,20$   
 FM III:  $R_F = 0,32$   
 Detektion: A, B (Raumtemperatur braun, Heizplatte hellblau)  
 EI-MS:  $m/z$  ( $I_{rel.}$  in %):  $M^+$  288 (3), 243 (17), 165 (7), 137 (1), 105 (100), 77 (26)  
 NMR: s. [3, 4]

### **3,4-Dimethoxybenzophenon (20)**

Die Synthese und Struktursicherung erfolgten nach [98] in der Arbeitsgruppe Pharmazeutische Chemie (Prof. Dr. Göber) am Institut für Pharmazie der HUB [4].



$M_r = 242,3$  g/mol

F<sub>P</sub>: 98-101 °C (Wasser-Ethanol-Gemisch)

HPLC:  $R_T = 16,2$  min (Methode I)

DC: FM I:  $R_F = 0,75$

FM II:  $R_F = 0,90$

FM III:  $R_F = 0,95$

Detektion: A, B (gelb)

EI-MS:  $m/z$  ( $I_{rel.}$  in %):  $M^+$  242 (25), 165 (100), 137 (14), 105 (55), 77 (73)

NMR: s. [3, 4]

### **4-Hydroxy-3-methoxybenzophenon (21)**

Die biomimetische Synthese und Strukturaufklärung erfolgten in der Arbeitsgruppe Pharmazeutische Chemie (Prof. Dr. Göber) am Institut für Pharmazie der HUB [4].



$M_r = 228,2$  g/mol

HPLC:  $R_T = 14,4$  min (Methode I)

DC: FM I:  $R_F = 0,55$

FM II:  $R_F = 0,47$

FM III:  $R_F = 0,42$

Detektion: A, B (gelb), D (blaugrün)

EI-MS:  $m/z$  ( $I_{rel.}$  in %):  $M^+$  228 (29), 151 (100), 123 (37), 105 (27), 77 (42)

NMR: s. [4]

### **(R,S)-Methyl 3,4-dimethoxybenzilat (35)**

Die Synthese und Struktursicherung erfolgten in der Arbeitsgruppe Pharmazeutische Chemie (Prof. Dr. Göber) am Institut für Pharmazie der HUB [3].

$C_{17}H_{18}O_5$

$M_r = 302,3$  g/mol

$F_p$ : 88-90 °C (Ethanol/Wasser)

HPLC:  $R_T = 14,4$  min (Methode I)

DC: FM I:  $R_F = 0,86$

FM II:  $R_F = 0,92$

Detektion: A, B (Raumtemperatur braun, Heizplatte hellblau)

EI-MS:  $m/z$  ( $I_{rel.}$  in %):  $M^+$  302 (4), 243 (17), 165 (7), 137 (2), 105 (100), 77 (28)

NMR: s. [3]

Nicht nachgewiesen:

### **3-Hydroxy-4-methoxybenzophenon**

Die biomimetische Synthese und Strukturaufklärung erfolgten in der Arbeitsgruppe Pharmazeutische Chemie (Prof. Dr. Göber) am Institut für Pharmazie der HUB [4].

$C_{14}H_{12}O_3$

$M_r = 228,2$  g/mol

HPLC:  $R_T = 14,4$  min (Methode I)

DC: FM I:  $R_F = 0,55$

FM II:  $R_F = 0,77$

FM III:  $R_F = 0,42$

Detektion: A, B (gelb), D (dunkelrot)

EI-MS:  $m/z$  ( $I_{rel.}$  in %):  $M^+$  228 (25), 151 (100), 123 (19), 105 (22), 77 (35)

NMR: s. [4]

### **(R,S)-N-Formyl-4-piperidyl 3,4-dimethoxybenzilat**

Die biomimetische Synthese und Strukturaufklärung erfolgten in der Arbeitsgruppe Pharmazeutische Chemie (Prof. Dr. Göber) am Institut für Pharmazie der HUB [4].

$C_{22}H_{25}NO_6$

$M_r = 399,4 \text{ g/mol}$

HPLC:  $R_T = 13,1 \text{ min}$  (Methode I)

DC: FM I:  $R_F = 0,50$

FM II:  $R_F = 0,89$

Detektion: A, B (Raumtemperatur braun, Heizplatte hellblau), C (orange)

EI-MS:  $m/z$  ( $I_{\text{rel.}}$  in %):  $M^+$  399 (2), 243 (65), 165 (8), 137 (1), 113 (7), 105 (100), 77 (16), 55 (20), 42 (14)

GC-MS:  $R_T = 17,7 \text{ min}$

$^1\text{H-NMR}$ :  $\delta$  [ppm]: 1,63 und 1,75 (4H,  $\text{CH}_2$ ); 3,16 und 3,45 (4H,  $\text{N-CH}_2$ ); 3,72 und 3,81 (je 3H,  $\text{OCH}_3$ ); 5,15 (1H,  $\text{CH}$ ); 6,75 (1H,  $\text{Ar-H}$ , C-5); 6,87 und 6,93 (2H,  $\text{Ar-H}$ , C-2, C-6); 7,19 - 7,37 (5H,  $\text{Ar-H}$ ); 7,91 (3H,  $\text{N-CHO}$ );

$^{13}\text{C-NMR}$ :  $\delta$  [ppm]: 29,8/29,9 ( $\text{CH}_2$ ); 31,1/31,2 ( $\text{CH}_2$ ); 36,3/36,4 ( $\text{N-CH}_2$ ); 42,4/42,5 ( $\text{N-CH}_2$ ); 56,3 ( $\text{OCH}_3$ ); 72,1 ( $\text{CH}$ ); 81,2 ( $\text{C}^*$ ); 110,7 ( $\text{Ar-C-2}$ ); 111,1 ( $\text{Ar-C-5}$ ); 120,1 ( $\text{Ar-C-6}$ ); 127,7 (2  $\text{Ar-}m\text{-C}$ ); 128,5 (2  $\text{Ar-}o\text{-C}$ ); 128,7 ( $\text{Ar-}p\text{-C}$ ); 134,4 ( $\text{Ar-C}$ ); 142,2 ( $\text{Ar-C-1}$ ); 149,1 ( $\text{Ar-C-4}$ ); 149,3 ( $\text{Ar-C-3}$ ); 161,0 ( $\text{CHO}$ ); 174,2 ( $\text{C=O}$ )

### **(R,S)-N-Methyl-4-piperidyl 3,4-dihydroxybenzilat**

Synthese und Analytik: s. [3]

$C_{20}H_{23}NO_5$

$M_r = 357,4 \text{ g/mol}$

### **2-(3,4-Dimethoxyphenyl)-2-phenylelessigsäure**

Synthese und Analytik: s. [3]

$C_{16}H_{16}O_4$

$M_r = 272,3 \text{ g/mol}$

$F_p$ : 58-62 °C (Wasser-Ethanol-Gemisch)

### **3,4-Dihydroxybenzophenon**

Synthese und Analytik: s. [3]

$C_{13}H_{10}O_3$

$M_r = 216,2 \text{ g/mol}$

F<sub>P</sub>: 128-133 °C (Wasser-Ethanol-Gemisch)

### 5.2.2.2 (R,S)-N-Methyl-3-piperidyl 3,4-dimethoxybenzilat (2) und verwandte Verbindungen

(vgl. Kapitel 5.2.2.1)

#### (R,S)-N-Methyl-3-piperidyl 3,4-dimethoxybenzilat (2)

Die Synthese und Struktursicherung erfolgten in der Arbeitsgruppe Pharmazeutische Chemie (Prof. Dr. Göber) am Institut für Pharmazie der HUB [3].

C<sub>22</sub>H<sub>27</sub>NO<sub>5</sub>

M<sub>r</sub> = 385,4 g/mol

F<sub>P</sub>: 82 – 85 °C (Diethylether)

HPLC: R<sub>T</sub> = 12,2 min (Methode I)

DC: FM I: R<sub>F</sub> = 0,76

FM II: R<sub>F</sub> = 0,92

Detektion: A, B (Raumtemperatur braun, Heizplatte hellblau), C (orange)

EI-MS: m/z (I<sub>rel.</sub> in %): M<sup>+</sup> 385 (1), 243 (8), 165 (6), 137 (3), 105 (65), 99 (15), 98 (25), 97 (100), 96 (12), 77 (27)

<sup>1</sup>H-NMR: δ [ppm]: 1,33 und 1,75 (2H, N-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>); 1,47 und 1,63 (2H, N-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>); 2,05 - 2,20 (je 1H, N-CH<sub>2</sub> und O-CH-CH<sub>2</sub>); 2,13 (3H, N-CH<sub>3</sub>); 2,37 (1H, N-CH<sub>2</sub>); 2,59 (1H, O-CH-CH<sub>2</sub>); 3,74 und 3,81 (je 3H, OCH<sub>3</sub>); 4,55 (1H, OH); 4,91 (1H, CH); 6,74 (1H, Ar-H, C-5); 6,94 und 6,98 (2H, Ar-H, C-2, C-6); 7,19 - 7,34 (5H, Ar-H)

<sup>13</sup>C-NMR: δ [ppm]: 22,3 (N-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>); 28,4 (N-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>); 46,2 (N-CH<sub>3</sub>); 55,1 (N-CH<sub>2</sub>); 55,79 und 55,84 (OCH<sub>3</sub>); 58,6 (O-CH-CH<sub>2</sub>); 72,1 (CH); 80,7 (C<sup>\*</sup>); 110,2 (Ar-C-5); 110,7 (Ar-C-2); 119,7 (Ar-C-6); 127,3 (2 Ar-m-C); 127,9 (2 Ar-o-C); 128,0 (Ar-p-C); 134,5 (Ar-C); 142,4 (Ar-C-1); 148,5 (Ar-C-4); 148,7 (Ar-C-3); 173,7 (C=O)

#### (R,S)-3-Piperidyl 3,4-dimethoxybenzilat (28)

Die Synthese und Struktursicherung erfolgten in der Arbeitsgruppe Pharmazeutische Chemie (Prof. Dr. Göber) am Institut für Pharmazie der HUB [4].

$C_{21}H_{25}NO_5$

$M_r = 371,4 \text{ g/mol}$

HPLC:  $R_T = 11,6 \text{ min}$  (Methode I)

DC: FM I:  $R_F = 0,56$

FM II:  $R_F = 0,62$

Detektion: A, B (Raumtemperatur braun, Heizplatte hellblau), C (orange)

EI-MS:  $m/z$  ( $I_{\text{rel.}}$  in %):  $M^+$  371 (<1), 243 (9), 165 (7), 137 (1), 105 (100), 85 (22), 84 (13), 83 (18), 82 (7), 77 (37)

NMR: s. [4]

### **(R,S)-N-Methyl-6-oxo-3-piperidyl 3,4-dimethoxybenzilat (32)**

0,98 g Quecksilber-(II)-acetat und 1,15 g Na-EDTA werden unter Rühren in 30 ml 1 % Essigsäure gelöst. Unter Einleiten von Stickstoff werden zu dieser heißen Lösung 0,42 g 2-HCl gegeben und 60 min unter Sieden erhitzt. Nach kurzer Zeit färbt sich die Lösung gelb und metallisches Quecksilber scheidet sich ab. Nach Abkühlen wird die Lösung filtriert, mit Natronlauge alkalisiert und dreimal mit je 25 ml Ether extrahiert. Die Etherphase wird darauf dreimal mit je 25 ml 2 % Salzsäure ausgeschüttelt, über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum eingeeengt.

Ausbeute: 33 % d. Th.

$C_{22}H_{25}NO_6$

$M_r = 399,4 \text{ g/mol}$

gelbes Öl

HPLC:  $R_T = 10,3 \text{ min}$  (Methode I)

DC: FM I:  $R_F = 0,58$

FM II:  $R_F = 0,78$

Detektion: A, B (Raumtemperatur braun, Heizplatte hellblau), C (orange)

EI-MS:  $m/z$  ( $I_{\text{rel.}}$  in %):  $M^+$  399 (1), 243 (13), 165 (6), 137 (1), 113 (50), 105 (100), 98 (7), 77 (25), 55 (12), 44 (6), 42 (5)

GC-MS:  $R_T = 16,5 \text{ min}$

$^1\text{H-NMR}$ :  $\delta$  [ppm]: 1,92 – 1,94 (2H, N-CO-CH<sub>2</sub>); 2,16 – 2,26 (2H, N-CO-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>); 2,73 (3H, N-CH<sub>3</sub>); 3,14 - 3,18 und 3,42 - 3,46 (2H, N-CH<sub>2</sub>); 3,71 und 3,79 (je 3H, OCH<sub>3</sub>); 5,24 (1H, CH); 5,76 (1H, OH); 6,74 (1H, Ar-H, C-5); 6,81 - 6,83 (1H, Ar-H, C-6); 6,90 – 6,95 (1H, Ar-H, C-2); 7,20 - 7,30 (5H, Ar-H)

$^{13}\text{C}$ -NMR:  $\delta$  [ppm]: 25,1 (N-CO- $\underline{\text{C}}\text{H}_2$ ); 27,0 (N-CO- $\text{CH}_2$ - $\underline{\text{C}}\text{H}_2$ ); 34,3 (N- $\underline{\text{C}}\text{H}_3$ ); 52,6 (N- $\underline{\text{C}}\text{H}_2$ ); 55,7 (O $\underline{\text{C}}\text{H}_3$ ); 68,3 ( $\underline{\text{C}}\text{H}$ ); 80,8 ( $\underline{\text{C}}^*$ ); 110,2 (Ar- $\underline{\text{C}}$ -5); 110,4 (Ar- $\underline{\text{C}}$ -2); 119,7 (Ar- $\underline{\text{C}}$ -6); 126,9 (2 Ar-*m*- $\underline{\text{C}}$ ); 128,0 (2 Ar-*o*- $\underline{\text{C}}$ ); 128,0 (Ar-*p*- $\underline{\text{C}}$ ); 133,7 (Ar- $\underline{\text{C}}$ -1); 141,5 (Ar- $\underline{\text{C}}$ ); 148,5 (Ar- $\underline{\text{C}}$ -4); 148,7 (Ar- $\underline{\text{C}}$ -3); 168,7 (N- $\underline{\text{C}}=\text{O}$ ); 173,7 ( $\underline{\text{C}}=\text{O}$ )

Nicht nachgewiesen:

### **(R,S)-N-Methyl-3-piperidyl 3,4-dimethoxybenzilat N-oxid (beide Isomere)**

Die Synthese und Struktursicherung erfolgten in der Arbeitsgruppe Pharmazeutische Chemie (Prof. Dr. Göber) am Institut für Pharmazie der HUB [4].

$\text{C}_{22}\text{H}_{27}\text{NO}_6$

$M_r = 401,4$  g/mol

HPLC:  $R_T = 12,3$  und  $12,7$  min (Methode I)

DC: FM I:  $R_F = 0,18$  und  $0,21$

FM II:  $R_F = 0,25$  und  $0,32$

Detektion: A, B (Raumtemperatur braun, Heizplatte hellblau), C (orange)

EI-MS:  $m/z$  ( $I_{\text{rel.}}$  in %): kein  $M^+$ , 385 (<1), 243 (12), 165 (31), 137 (4), 105 (100), 99 (11), 98 (11), 97 (58), 96 (7), 77 (41)

NMR: s. [4]

### **(R,S)-N-Formyl-3-piperidyl 3,4-dimethoxybenzilat**

Die biomimetische Synthese und Strukturaufklärung erfolgten in der Arbeitsgruppe Pharmazeutische Chemie (Prof. Dr. Göber) am Institut für Pharmazie der HUB [4].

$\text{C}_{22}\text{H}_{25}\text{NO}_6$

$M_r = 399,4$  g/mol

HPLC:  $R_T = 12,9$  min (Methode I)

DC: FM I:  $R_F = 0,80$

FM II:  $R_F = 0,95$

Detektion: A, B (Raumtemperatur braun, Heizplatte hellblau), C (orange)

EI-MS:  $m/z$  ( $I_{\text{rel.}}$  in %):  $M^+$  399 (1), 243 (22), 165 (5), 137 (1), 113 (28), 105 (100), 77 (23)

### **(R,S)-Methyl 2-(3,4-dimethoxyphenyl)-2-phenylacetat**

10 mmol 3,4-Dimethoxydiphenyllessigsäure und 20 mmol Natriumhydrogencarbonat werden in einem 50 ml-Rundkolben in 15 ml Dimethylformamid suspendiert. Die Mischung wird nach Zugabe von 45 mmol Dimethylsulfat 10 min bei Raumtemperatur und dann 10 min auf dem Wasserbad bei 80 - 90 °C gerührt. Anschließend wird das Reaktionsgemisch in 200 ml Wasser aufgenommen und nach dem Erkalten dreimal mit Chloroform extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden mit Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum eingeeengt.

Ausbeute: 69 % d. Th.

$C_{17}H_{18}O_4$

$M_r = 286,3$  g/mol

HPLC:  $R_T = 17,2$  min (Methode I)

DC: FM I:  $R_F = 0,87$

FM II:  $R_F = 0,91$

Detektion: A, B (Raumtemperatur gelblich, Heizplatte altrosa)

IR:  $[cm^{-1}]$ : 1514, 1591 (C=C), 1737 (C=O), 2837 (OCH<sub>3</sub>)

EI-MS:  $m/z$  ( $I_{rel.}$  in %):  $M^+$  286 (13), 227 (100), 196 (17), 183 (9), 181 (16), 153 (14), 152 (17), 115 (24)

$^1H$ -NMR:  $\delta$  [ppm]: 3,65 (3H,  $\underline{CH_3}$ ); 3,74 und 3,76 (je 3H,  $\underline{OCH_3}$ ); 4,90 (1H,  $\underline{CH}$ ); 6,71 (1H,  $\underline{Ar-H}$ , C-5); 6,74 und 6,77 (2H,  $\underline{Ar-H}$ , C-2, C-6); 7,22 (5H,  $\underline{Ar-H}$ )

$^{13}C$ -NMR:  $\delta$  [ppm]: 52,1 ( $\underline{CH_3}$ ); 55,7 ( $\underline{OCH_3}$ ); 56,3 ( $\underline{CH}$ ); 110,9 ( $\underline{Ar-C-5}$ ); 111,7 ( $\underline{Ar-C-2}$ ); 120,7 ( $\underline{Ar-C-6}$ ); 127,1 (2  $\underline{Ar-m-C}$ ); 128,2 (2  $\underline{Ar-o-C}$ ); 128,4 ( $\underline{Ar-p-C}$ ); 130,8 ( $\underline{Ar-C}$ ); 138,7 ( $\underline{Ar-C-1}$ ); 148,1 ( $\underline{Ar-C-4}$ ); 148,8 ( $\underline{Ar-C-3}$ ); 173,0 ( $\underline{C=O}$ )

### **(R,S)-N-Methyl-3-piperidyl 2-(3,4-dimethoxyphenyl)-2-phenylacetat**

In einen Rundkolben werden 10 mmol (R,S)-Methyl 2-(3,4-dimethoxyphenyl)-2-phenylacetat und 11,7 mmol N-Methyl-3-piperidinol in 70 ml Petroleumbenzin vorgelegt. Zur Entfernung von Wasserspuren werden 20 ml Lösungsmittel abdestilliert und anschließend 0,4 ml einer frisch bereiteten 10 %igen methanolischen Natriummethanolatlösung zugetropft. Die Destillationsgeschwindigkeit wird so eingestellt, dass innerhalb von 5 h das Petroleumbenzin sowie vorhandenes und entstandenes Methanol abgetrieben wird, wobei nach 3 h noch einmal eine Zugabe von Natriummethanolatlösung erfolgt.



Der Rückstand wird in 50 ml Chloroform aufgenommen und dreimal mit 10 %iger Weinsäure extrahiert. Die Weinsäurephasen werden vereinigt, mit 4 M Natriumhydroxid vorsichtig alkalisiert und sofort dreimal mit Chloroform extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über Natriumsulfat getrocknet, im Vakuum eingeeengt und umkristallisiert.

Ausbeute: 82 % d. Th.

$C_{22}H_{27}NO_4$

$M_r = 369,4$  g/mol

$F_P$ : 73 – 75 °C (Diethylether)

HPLC:  $R_T = 14,3$  min (Methode I)

DC: FM I:  $R_F = 0,80$

FM II:  $R_F = 0,94$

Detektion: A, B (Raumtemperatur rosé, Heizplatte braun), C (orange)

IR:  $[cm^{-1}]$ : 1515, 1591 (C=C), 1732 (C=O), 2786 (N-CH<sub>3</sub>), 2836 (OCH<sub>3</sub>), 2941 (CH<sub>2</sub>)

EI-MS:  $m/z$  ( $I_{rel.}$  in %):  $M^+$  369 (1), 227 (8), 196 (3), 183 (3), 181 (3), 153 (3), 152 (4), 115 (4), 99 (1), 98 (13), 97 (100), 96 (14)

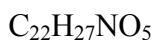
$^1H$ -NMR:  $\delta$  [ppm]: 1,35 und 1,69 (2H, N-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>); 1,50 und 1,63 (2H, N-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>); 2,07 und 2,11 (je 1H, N-CH<sub>2</sub> und O-CH-CH<sub>2</sub>); 2,16 (3H, N-CH<sub>3</sub>); 2,35 (1H, N-CH<sub>2</sub>); 2,59 (1H, O-CH-CH<sub>2</sub>); 3,74 und 3,76 (je 3H, OCH<sub>3</sub>); 4,91 (1H, CH); 6,73 (1H, Ar-H, C-5); 6,77 und 6,80 (2H, Ar-H, C-2, C-6); 7,15-7,23 (5H, Ar-H)

$^{13}C$ -NMR:  $\delta$  [ppm]: 22,4 (N-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>); 28,5 (N-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>); 46,2 (N-CH<sub>3</sub>); 55,1 (N-CH<sub>2</sub>); 55,7 (OCH<sub>3</sub>); 56,3 (CH); 58,9 (O-CH-CH<sub>2</sub>); 70,1 (C\*); 110,9 (Ar-C-5); 111,7 (Ar-C-2); 120,7 (Ar-C-6); 127,0 (2 Ar-*m*-C); 128,2 (2 Ar-*o*-C); 128,4 (Ar-*p*-C); 131,1 (Ar-C); 138,9 (Ar-C-1); 148,1 (Ar-C-4); 148,8 (Ar-C-3); 171,9 (C=O)

### 5.2.2.3 N-Methyl-4-piperidyl 3,3'-dimethoxybenzilat (**3**) und verwandte Verbindungen

#### N-Methyl-4-piperidyl 3,3'-dimethoxybenzilat (**3**)

Die Synthese und Struktursicherung erfolgten in der Arbeitsgruppe Pharmazeutische Chemie (Prof. Dr. Göber) am Institut für Pharmazie der HUB [3].



$M_r = 385,4 \text{ g/mol}$

$F_p$ : 118 – 120 °C (Chloroform/Diethylether)

HPLC:  $R_T = 13,6 \text{ min}$  (Methode II)

DC: FM I:  $R_F = 0,54$

FM II:  $R_F = 0,89$

FM III:  $R_F = 0,88$

Detektion: A, B (Raumtemperatur grün, Heizplatte grau), C (orange)

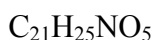
EI-MS:  $m/z$  ( $I_{\text{rel.}}$  in %):  $M^+$  385 (3), 243 (24), 135 (100), 107 (27), 99 (59), 98 (70), 97 (17), 96 (68), 92 (15), 77 (16)

$^1\text{H-NMR}$ :  $\delta$  [ppm]: 1,64 und 1,79 (4H,  $\text{CH}_2$ ); 2,08 (3H,  $\text{N-CH}_3$ ); 2,15 - 2,25 (4H,  $\text{N-CH}_2$ ); 3,68 (je 3H,  $\text{OCH}_3$ ); 4,51 (1H,  $\text{OH}$ ); 4,89 (1H,  $\text{CH}$ ); 6,76 (2H,  $\text{Ar-H}$ , C-4, C-4'); 6,94 (2H,  $\text{Ar-H}$ , C-6, C-6'); 6,95 (2H,  $\text{Ar-H}$ , C-2, C-2'); 7,16 (2H,  $\text{Ar-H}$ , C-5, C-5')

$^{13}\text{C-NMR}$ :  $\delta$  [ppm]: 30,3 ( $\text{CH}_2$ ); 46,0 ( $\text{N-CH}_3$ ); 52,0 ( $\text{N-CH}_2$ ); 55,2 ( $\text{OCH}_3$ ); 72,2 ( $\text{CH}$ ); 80,7 ( $\text{C}^*$ ); 113,3 ( $\text{Ar-C-2}$ ,  $\text{Ar-C-2'}$ ); 113,4 ( $\text{Ar-C-4}$ ,  $\text{Ar-C-4'}$ ); 119,9 ( $\text{Ar-C-6}$ ,  $\text{Ar-C-6'}$ ); 128,9 ( $\text{Ar-C-5}$ ,  $\text{Ar-C-5'}$ ); 143,6 ( $\text{Ar-C-1}$ ,  $\text{Ar-C-1'}$ ); 159,3 ( $\text{Ar-C-3}$ ,  $\text{Ar-C-3'}$ ); 173,6 ( $\text{C=O}$ )

#### 4-Piperidyl 3,3'-dimethoxybenzilat (**42**)

Die Synthese und Struktursicherung erfolgten in der Arbeitsgruppe Pharmazeutische Chemie (Prof. Dr. Göber) am Institut für Pharmazie der HUB [4].



$M_r = 371,4 \text{ g/mol}$

$F_p$ : 152-154 °C (Chloroform/Diethylether)

HPLC:  $R_T = 8,6 \text{ min}$  (Methode II)

DC: FM I:  $R_F = 0,21$

FM II:  $R_F = 0,26$

FM III:  $R_F = 0,38$

Detektion: A, B (Raumtemperatur grün, Heizplatte grau), C (orange)

EI-MS:  $m/z$  ( $I_{rel.}$  in %):  $M^+$  371 (1), 243 (32), 135 (100), 107 (35), 92 (19), 85 (65), 84 (55), 83 (12), 82 (35), 77 (21)

NMR: s. [4]

### **(R,S)-N-Methyl-2-oxo-4-piperidyl 3,3'-dimethoxybenzilat (45)**

Synthese: s. Vergleichssubstanz (13), Rührtemperatur 5 – 10 °C

Ausbeute: 2 % d. Th.

$C_{22}H_{25}NO_6$

$M_r = 399,4$  g/mol

gelbes Öl

HPLC:  $R_T = 8,5$  min (Methode II)

DC: FM I:  $R_F = 0,58$

FM II:  $R_F = 0,78$

Detektion: A, B (Raumtemperatur grün, Heizplatte grau), C (orange)

EI-MS:  $m/z$  ( $I_{rel.}$  in %):  $M^+$  399 (1), 243 (15), 135 (100), 113 (73); 107 (20), 92 (11), 77 (17), 55 (18), 44 (11)

GC-MS:  $R_T = 17,2$  min

$^1H$ -NMR:  $\delta$  [ppm]: 1,95 (2H, N-CO-CH<sub>2</sub>); 2,48 - 2,66 (2H, N-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>); 2,76 (3H, N-CH<sub>3</sub>); 3,01 und 3,59 (2H, N-CH<sub>2</sub>); 3,69 und 3,70 (je 3H, OCH<sub>3</sub>); 5,25 (1H, CH); 6,80 (2H, Ar-H, C-4, C-4'); 6,88 (2H, Ar-H, C-6, C-6'); 6,94 (2H, Ar-H, C-2, C-2'); 7,19 (2H, Ar-H, C-5, C-5')

$^{13}C$ -NMR:  $\delta$  [ppm]: 26,7 (CH<sub>2</sub>); 34,4 (N-CH<sub>3</sub>); 36,8 (N-CH<sub>2</sub>); 44,8 (N-CO-CH<sub>2</sub>); 55,3 (OCH<sub>3</sub>); 70,2 (CH); 80,8 (C\*); 113,2 (Ar-C-2, Ar-C-2'); 113,6 (Ar-C-4, Ar-C-4'); 119,8 (Ar-C-6, Ar-C-6'); 129,3 (Ar-C-5, Ar-C-5'); 141,5 (Ar-C-1, Ar-C-1'); 159,5 (Ar-C-3, Ar-C-3'); 169,9 (N-C=O); 176,8 (C=O)

### **3,3'-Dimethoxybenzilsäure (46)**

Die Synthese und Struktursicherung erfolgten in der Arbeitsgruppe Pharmazeutische Chemie (Prof. Dr. Göber) am Institut für Pharmazie der HUB [3].

$C_{16}H_{16}O_5$

$M_r = 288,3 \text{ g/mol}$

$F_p$ : 105-106 °C (Ethanol)

HPLC:  $R_T = 3,4 \text{ min}$  (Methode II)

DC: FM I:  $R_F = 0,23$

FM II:  $R_F = 0,28$

FM III:  $R_F = 0,36$

Detektion: A, B (Raumtemperatur grün, Heizplatte grau)

EI-MS:  $m/z$  ( $I_{\text{rel.}}$  in %):  $M^+$  288 (3), 243 (17), 135 (100), 107 (30), 92 (18), 77 (26)

NMR: s. [3, 4]

### **3,3'-Dimethoxybenzophenon (51)**

Die Synthese und Struktursicherung erfolgten in der Arbeitsgruppe Pharmazeutische Chemie (Prof. Dr. Göber) am Institut für Pharmazie der HUB [4].

$C_{15}H_{14}O_3$

$M_r = 242,3 \text{ g/mol}$

HPLC:  $R_T = 11,3 \text{ min}$  (Methode II)

DC: FM I:  $R_F = 0,91$

FM II:  $R_F = 0,94$

FM III:  $R_F = 0,90$

Detektion: A, B (gelb)

EI-MS:  $m/z$  ( $I_{\text{rel.}}$  in %):  $M^+$  242 (15), 135 (100), 107 (37), 92 (32), 77 (49)

NMR: s. [4]

### **Methyl 3,3'-dimethoxybenzilat (68)**

Die Synthese und Struktursicherung erfolgten in der Arbeitsgruppe Pharmazeutische Chemie (Prof. Dr. Göber) am Institut für Pharmazie der HUB [3].

$C_{17}H_{18}O_5$

$M_r = 302,3 \text{ g/mol}$

$F_p$ : 69-70 °C (Methanol/Wasser)

HPLC:  $R_T = 10,0 \text{ min}$  (Methode II)

DC: FM I:  $R_F = 0,80$

FM II:  $R_F = 0,91$

FM III:  $R_F = 0,92$

Detektion: A, B (Raumtemperatur grün, Heizplatte grau)

EI-MS:  $m/z$  ( $I_{\text{rel.}}$  in %):  $M^+$  302 (1), 243 (22), 135 (100), 107 (29), 92 (15), 77 (23)

NMR: s. [3]

Nicht nachgewiesen:

### **(R,S)-N-Formyl-4-piperidyl 3,3'-dimethoxybenzilat**

Die biomimetische Synthese und Strukturaufklärung erfolgten in der Arbeitsgruppe Pharmazeutische Chemie (Prof. Dr. Göber) am Institut für Pharmazie der HUB [4].

$C_{22}H_{25}NO_6$

$M_r = 399,4$  g/mol

HPLC:  $R_T = 9,0$  min (Methode II)

DC: FM I:  $R_F = 0,60$

FM II:  $R_F = 0,92$

Detektion: A, B (Raumtemperatur grün, Heizplatte grau), C (orange)

EI-MS:  $m/z$  ( $I_{\text{rel.}}$  in %):  $M^+$  399 (1), 243 (16), 135 (100), 113 (55), 107 (32), 92 (15), 77 (24), 55 (17), 42 (12)

GC-MS:  $R_T = 18,1$  min

$^1\text{H-NMR}$ :  $\delta$  [ppm]: 1,7 (4H,  $\underline{\text{CH}_2}$ ); 3,14 und 3,48 (4H,  $\text{N-}\underline{\text{CH}_2}$ ); 3,71 (je 6H,  $\text{OCH}_3$ ); 4,2 (1H,  $\text{OH}$ ); 5,2 (1H,  $\underline{\text{CH}}$ ); 6,79 (2H,  $\text{Ar-}\underline{\text{H}}$ , C-4, C-4'); 6,90 (2H,  $\text{Ar-}\underline{\text{H}}$ , C-6, C-6'); 6,93 (2H,  $\text{Ar-}\underline{\text{H}}$ , C-2, C-2'); 7,2 (2H,  $\text{Ar-}\underline{\text{H}}$ , C-5, C-5'); 7,9 (3H,  $\text{N-}\underline{\text{CHO}}$ );

$^{13}\text{C-NMR}$ :  $\delta$  [ppm]: 29,3 ( $\underline{\text{CH}_2}$ ); 30,7 ( $\underline{\text{CH}_2}$ ); 35,8 ( $\text{N-}\underline{\text{CH}_2}$ ); 42,0 ( $\text{N-}\underline{\text{CH}_2}$ ); 55,2 ( $\text{OCH}_3$ ); 71,8 ( $\underline{\text{CH}}$ ); 80,8 ( $\underline{\text{C}}^*$ ); 113,3 ( $\text{Ar-}\underline{\text{C-2}}$ ,  $\text{Ar-}\underline{\text{C-2'}}$ ); 113,4 ( $\text{Ar-}\underline{\text{C-4}}$ ,  $\text{Ar-}\underline{\text{C-4'}}$ ); 119,7 ( $\text{Ar-}\underline{\text{C-6}}$ ,  $\text{Ar-}\underline{\text{C-6'}}$ ); 129,1 ( $\text{Ar-}\underline{\text{C-5}}$ ,  $\text{Ar-}\underline{\text{C-5'}}$ ); 143,1 ( $\text{Ar-}\underline{\text{C-1}}$ ,  $\text{Ar-}\underline{\text{C-1'}}$ ); 159,3 ( $\text{Ar-}\underline{\text{C-3}}$ ,  $\text{Ar-}\underline{\text{C-3'}}$ ); 159,4 ( $\underline{\text{CHO}}$ ); 173,5 ( $\underline{\text{C=O}}$ )

### **(R,S)-N-Methyl-4-piperidyl 3,4-dimethoxybenzilat N-oxid (beide Isomere)**

Die Synthese und Struktursicherung erfolgten in der Arbeitsgruppe Pharmazeutische Chemie (Prof. Dr. Göber) am Institut für Pharmazie der HUB [4].

$C_{22}H_{27}NO_6$

$M_r = 401,4$  g/mol

HPLC:  $R_T = 8,3$  und  $8,5$  min (Methode II)

DC: FM I:  $R_F = 0,23$  und  $0,35$   
 FM II:  $R_F = 0,30$  und  $0,37$   
 FM III:  $R_F = 0,48$  und  $0,62$   
 Detektion: A, B (Raumtemperatur grün, Heizplatte grau), C (orange)

EI-MS:  $m/z$  ( $I_{\text{rel.}}$  in %): kein  $M^+$ , 243 (14), 135 (100), 107 (36), 99 (16), 98 (21), 97 (5), 96 (23), 92 (25), 77 (36)

NMR: s. [4]

#### 5.2.2.4 (R,S)-N-Methyl-3-piperidyl 3,3'-dimethoxybenzilat (**4**) und verwandte Verbindungen

(vgl. Kapitel 5.2.2.3)

##### (R,S)-N-Methyl-3-piperidyl 3,3'-dimethoxybenzilat (**4**)

Die Synthese und Struktursicherung erfolgten in der Arbeitsgruppe Pharmazeutische Chemie (Prof. Dr. Göber) am Institut für Pharmazie der HUB [3].

$C_{22}H_{27}NO_5$

$M_r = 385,4$  g/mol

$F_p$ : 66-70 °C (Methanol/Wasser)

HPLC:  $R_T = 11,5$  min (Methode II)

DC: FM I:  $R_F = 0,74$

FM II:  $R_F = 0,89$

FM III:  $R_F = 0,89$

Detektion: A, B (Raumtemperatur grün, Heizplatte grau), C (orange)

EI-MS:  $m/z$  ( $I_{\text{rel.}}$  in %):  $M^+$  385 (<1), 243 (5), 135 (24), 107 (12), 99 (4), 98 (14), 97 (100), 96 (13), 92 (12), 77 (8)

$^1\text{H-NMR}$ :  $\delta$  [ppm]: 1,34 und 1,75 (2H, N-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>); 1,49 und 1,61 (2H, N-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>); 2,10 - 2,20 (je 1H, N-CH<sub>2</sub> und O-CH-CH<sub>2</sub>); 2,11 (3H, N-CH<sub>3</sub>); 2,54 - 2,59 (je 1H, O-CH-CH<sub>2</sub> und N-CH<sub>2</sub>); 3,67/3,68 (je 3H, OCH<sub>3</sub>); 4,92 (1H, CH); 6,75 (2H, Ar-H, C-4, C-4'); 6,91 - 6,99 (4H, Ar-H, C-2, C-2', C-6, C-6'); 7,15 (2H, Ar-H, C-5, C-5')

$^{13}\text{C-NMR}$ :  $\delta$  [ppm]: 22,2 (N-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>); 28,4 (N-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>); 46,0 (N-CH<sub>3</sub>); 55,0 (N-CH<sub>2</sub>); 55,2 (OCH<sub>3</sub>); 58,5 (O-CH-CH<sub>2</sub>); 72,0 (CH); 80,8 (C\*); 113,0

(Ar-C-2, Ar-C-2'); 113,4 (Ar-C-4, Ar-C-4'); 119,8 (Ar-C-6, Ar-C-6');  
128,8 (Ar-C-5, Ar-C-5'); 143,6 (Ar-C-1, Ar-C-1'); 159,3 (Ar-C-3, Ar-C-3'); 173,3 (C=O)

**(R,S)-3-Piperidyl 3,3'-dimethoxybenzilat (60)**

Die Synthese und Struktursicherung erfolgten in der Arbeitsgruppe Pharmazeutische Chemie (Prof. Dr. Göber) am Institut für Pharmazie der HUB.

$C_{21}H_{25}NO_5$

$M_r = 371,4 \text{ g/mol}$

HPLC:  $R_T = 9,4 \text{ min}$  (Methode II)

DC: FM I:  $R_F = 0,55$

FM II:  $R_F = 0,82$

FM III:  $R_F = 0,88$

Detektion: A, B (Raumtemperatur grün, Heizplatte grau), C (orange)

EI-MS:  $m/z$  ( $I_{rel.}$  in %):  $M^+$  371 (<1), 243 (4), 135 (27), 107 (11), 92 (12), 85 (9), 84 (16), 83 (100), 82 (16)

Nicht nachgewiesen:

**(R,S)-N-Methyl-3-piperidyl 3,3'-dimethoxybenzilat N-oxid (beide Isomere)**

Die Synthese und Struktursicherung erfolgten in der Arbeitsgruppe Pharmazeutische Chemie (Prof. Dr. Göber) am Institut für Pharmazie der HUB.

$C_{22}H_{27}NO_6$

$M_r = 401,4 \text{ g/mol}$

HPLC:  $R_T = 8,2 \text{ und } 8,6 \text{ min}$  (Methode II)

DC: FM I:  $R_F = 0,22 \text{ und } 0,33$

FM II:  $R_F = 0,25 \text{ und } 0,32$

Detektion: A, B (Raumtemperatur grün, Heizplatte grau), C (orange)

**N-Methyl-6-oxo-3-piperidyl 3,3'-dimethoxybenzilat**

Synthese: s. Vergleichssubstanz 32

Ausbeute: 13 % (der Theorie)

$C_{22}H_{25}NO_6$

$M_r = 399,4 \text{ g/mol}$

gelbes Öl

HPLC:  $R_T = 8,2 \text{ min}$  (Methode II)

DC: FM I:  $R_F = 0,54$

FM II:  $R_F = 0,79$

Detektion: A, B (Raumtemperatur grün, Heizplatte grau), C (orange)

EI-MS:  $m/z$  ( $I_{\text{rel.}}$  in %):  $M^+$  399 (>1), 243 (11), 135 (100), 113 (70); 107 (34), 98 (7), 92 (14), 77 (25), 55 (10), 42 (8)

GC-MS:  $R_T = 18,0 \text{ min}$

$^1\text{H-NMR}$ :  $\delta$  [ppm]: 1,95 (2H, N-CO-CH $\underline{2}$ ); 2,16 - 2,30 (2H, N-CO-CH $\underline{2}$ -CH $\underline{2}$ ); 2,77 (3H, N-CH $\underline{3}$ ); 3,23 und 3,46 (2H, N-CH $\underline{2}$ ); 3,69 (je 3H, OCH $\underline{3}$ ); 5,26 (1H, CH); 6,77-6,80 (2H, Ar-H, C-4, C-4'); 6,86-6,93 (4H, Ar-H, C-2, C-2', C-6, C-6'); 7,15 - 7,20 (2H, Ar-H, C-5, C-5')

$^{13}\text{C-NMR}$ :  $\delta$  [ppm]: 25,1 (N-CO-CH $\underline{2}$ ); 27,0 (N-CO-CH $\underline{2}$ -CH $\underline{2}$ ); 34,6 (N-CH $\underline{3}$ ); 52,9 (N-CH $\underline{2}$ ); 55,2 (OCH $\underline{3}$ ); 68,6 (CH); 80,9 (C $\underline{^*}$ ); 113,3 (Ar-C-2, Ar-C-2'); 113,5 (Ar-C-4, Ar-C-4'); 119,5 (Ar-C-6, Ar-C-6'); 129,1 (Ar-C-5, Ar-C-5'); 142,8 (Ar-C-1, Ar-C-1'); 159,4 (Ar-C-3, Ar-C-3'); 168,9 (N-C=O); 173,3 (C=O)



## **5.3 Biotransformationsuntersuchungen**

### **5.3.1 Tiermaterial**

Die Biotransformationsuntersuchungen von **1**, **2**, **3** und **4** wurden an jeweils 16 männlichen Wistarratten mit einem Körpergewicht von 200 bis 400 g, die von der Tierzucht Schönwalde GmbH stammten, durchgeführt. Die Tiere wurden bei einer Lufttemperatur von 20 °C und einer Luftfeuchtigkeit von 55 - 60 % im 12 h Hell-Dunkel-Rhythmus gehalten. Während der Versuche saßen sie zu zweit 48 h in Stoffwechselkäfigen, die eine getrennte Entnahme von Urin und Kot ermöglichten. Sie erhielten die ganze Zeit Altromin Standard-Diät für Ratten - Mäuse und Leitungswasser ad libitum.

### **5.3.2 Applikation und Gewinnung der biologischen Proben**

Mittels Schlundsonde sind den Ratten im Abstand von 7 Tagen abwechselnd 200 mg/kg, 100 mg/kg, 50 mg/kg des jeweiligen Benzilsäureesters als Hydrochlorid oder reines Leitungswasser in den Magen appliziert worden. Bei einer Dosierung von 200 mg/kg wurden 40 mg/ml Wasser gelöst und entsprechend dem Gewicht der Ratte verabreicht (eine 200 g schwere Ratte bekam 1 ml Wirkstofflösung). Bei den anderen Dosierungen wurden entsprechend verdünnte Lösungen benutzt. Urin und Kot sind getrennt in 24 h- und 48 h- Fraktionen gesammelt und bei –15 °C eingefroren worden.

### **5.3.3 Probenvorbereitung**

#### **5.3.3.1 Ermittlung der besten Reinigungsmethode**

Drei Methoden wurden in ihrer Eignung zur Reinigung des biologischen Materials überprüft. Zur Bestimmung der Wiederfindung wurden 100 mg von **1**, **2**, **3** und **4** in 25 ml Eigenurin gelöst. 2,5 ml dieser Lösung wurden zu 25,0 ml Urin aufgefüllt.

##### **5.3.3.1.1 Reinigung durch Flüssig-Flüssig-Extraktion**

20,0 ml dieser Lösung wurden dreimal mit je 15 ml des jeweiligen Lösungsmittels extrahiert und aufgrund ungenügender Phasentrennung zentrifugiert. Nach Einengung der organischen Phasen und Aufnahme der Rückstände in 20,0 ml Wasser wurden die

Wiederfindungen jeweils durch Dreifachbestimmung mittels HPLC ermittelt.

Wiederfindungsrate:	<u>1</u>	-	Dichlormethan	$\bar{x} = 90,7 \%$ (88,9 - 91,4 %)
			Essigsäureethylester	$\bar{x} = 88,3 \%$ (87,8 - 89,2 %)
			Diethylether	$\bar{x} = 81,5 \%$ (80,1 - 83,4 %)
	<u>2</u>	-	Dichlormethan	$\bar{x} = 87,7 \%$ (87,3 - 88,5 %)
			Essigsäureethylester	$\bar{x} = 91,2 \%$ (89,7 - 92,3 %)
			Diethylether	$\bar{x} = 81,5 \%$ (80,8 - 82,3 %)
	<u>3</u>	-	Dichlormethan	$\bar{x} = 77,8 \%$ (76,2 - 79,6 %)
			Essigsäureethylester	$\bar{x} = 80,2 \%$ (80,1 - 80,4 %)
			Diethylether	$\bar{x} = 73,6 \%$ (72,5 - 74,2 %)
	<u>4</u>	-	Dichlormethan	$\bar{x} = 79,5 \%$ (79,1 - 80,4 %)
			Essigsäureethylester	$\bar{x} = 79,8 \%$ (78,3 - 80,6 %)
			Diethylether	$\bar{x} = 70,6 \%$ (69,8 - 71,0 %)

#### 5.3.3.1.2 Reinigung durch Flüssig-Flüssig-Extraktion mittels Extrelut<sup>®</sup>

20,0 ml der Lösung wurden auf Extrelut<sup>®</sup> 20-Säulen aufgegeben, 15 Minuten zum Einziehen belassen und danach mit 40 ml Essigsäureethylester eluiert. Die organische Phase wurde eingeeengt und in 20,0 ml Wasser aufgenommen. Die Wiederfindung konnte durch Dreifachbestimmung mittels HPLC ermittelt werden.

Wiederfindungsrate:	<u>1</u>	-	$\bar{x} = 98,5 \%$ (98,1 - 98,8 %)
	<u>2</u>	-	$\bar{x} = 100,0 \%$ (99,3 - 100,4 %)
	<u>3</u>	-	$\bar{x} = 95,2 \%$ (94,4 - 95,7 %)
	<u>4</u>	-	$\bar{x} = 89,5 \%$ (88,9 - 90,0 %)

#### 5.3.3.1.3 Reinigung durch Flüssig-Fest-Extraktion mittels Amberlite<sup>®</sup> XAD-2

Bei der Aufarbeitung der Proben mit Hilfe des Adsorberharz Amberlite<sup>®</sup> XAD-2 erfolgte zunächst die Konditionierung des Materials. Dazu wurde das Harz in Wasser suspendiert und in eine Glassäule gefüllt (Innendurchmesser 10 mm, Länge 15 cm). Vor Auftragen der Urinprobe erfolgt eine Reinigung und Aktivierung des Materials durch Spülung der Säule nacheinander mit 50 ml Methanol, 50 ml Methanol/Salzsäure (0,01 M) 1:1, 50 ml Salzsäure (0,01 M), 50 ml Natronlauge (0,01 M) und 50 ml destilliertem Wasser. Anschließend wurden 20,0 ml der Urinlösung aufgetragen und

nach Einwirken mit 100 ml destilliertem Wasser gewaschen. Die Elution erfolgte mit 50 ml Methanol. Diese Lösung wurde eingengt und der Rückstand in 20,0 ml Wasser aufgenommen. Die Wiederfindung wurde durch Dreifachbestimmung mittels HPLC ermittelt. Auf die Angabe der Schwankungsbreiten wird aufgrund starker Abweichungen in den Werten verzichtet.

Wiederfindungsrate: 1 -  $\bar{x} = 41,2 \%$

2 -  $\bar{x} = 33,2 \%$

3 -  $\bar{x} = 27,9 \%$

4 -  $\bar{x} = 25,8 \%$

### 5.3.3.2 Aufarbeitung

Die Harn- und Kotproben wurden nach Lyophilisation viermal erschöpfend mit 30 °C warmen Methanol extrahiert. Dabei entsprach die Menge Lösungsmittel dem ursprünglichen Probengewicht vor der Gefriertrocknung. Die Filtrate wurden eingengt und mit Wasser so aufgefüllt, dass ein Drittel der früheren Menge an Urin oder Kot erreicht wurde. Je 20 ml Konzentrat wurden 0,5 g Ammoniumchlorid zugesetzt und mit verdünnter Salzsäure auf einen pH-Wert von 2 eingestellt. Diese Lösung wurde auf eine Extrelut® 20-Säule aufgebracht und nach 15minütigem Einziehen mit 40 ml Essigsäureethylester eluiert. Auf der Säule verbliebenes Elutionsmittel konnte durch Absaugen gewonnen werden. Durch anschließendes Einengen und Aufnahme in Methanol ist die Fraktion der unkonjugierten Säuren und Neutralstoffe erhalten worden. Mit einer Pumpe wurde Ammoniakdampf durch die Säulen gezogen. Das Ende der Äquilibration konnte aufgrund der basischen Reaktion einer Phenolphthaleinlösung, die hinter die Säule geschaltet war, indiziert werden. Nach Elution mit 40 ml Dichlormethan/Isopropanol (85:15) wurde die Fraktion der basischen unkonjugierten Metaboliten erhalten. Das ursprüngliche Urinkonzentrat konnte durch Aufgabe von 40 ml gesättigter Natriumchloridlösung wiedergewonnen werden, indem dieses zuerst das restliche Lösungsmittel und dann die aufgezogene wässrige Lösung verdrängte. Diese Lösung enthielt die konjugierten Metabolite. Sie wurde mit verdünnter Salzsäure auf einen pH-Wert von 5 eingestellt, mit 80 µl des Enzymgemischs von  $\beta$ -Glucuronidase/Arylsulfatase versetzt und 24 Stunden bei 37 °C zur Konjugatspaltung inkubiert. Zu 20 ml dieser Lösung wurden 0,5 g Ammoniumchlorid gegeben und, wie

oben beschrieben, weiter verfahren. Es wurden nun die Fraktionen der ursprünglich konjugierten Metabolite gewonnen.

#### **5.3.4 Trennung und Isolierung der Metabolite**

Die sauren und basischen Metabolitenfraktionen in Methanol wurden bandenförmig auf DC-Alufolien oder PSC-Fertigplatten, Kieselgel 60 F<sub>254</sub>, 20 x 20 cm aufgetragen und eluiert. Die einzelnen Metabolitenbanden wurden ausgeschnitten oder ausgekratzt und mit Methanol extrahiert. Die filtrierte Rückstände konnten nun den weiteren analytischen Untersuchungen zugeführt werden.

## **5.4 Analytische Methoden**

### **5.4.1 Dünnschichtchromatographie**

#### **5.4.1.1 Analytische Dünnschichtchromatographie**

Für die analytische DC wurden DC-Alufolien, Kieselgel 60 F<sub>254</sub>, 20 x 20 cm (Merck) verwendet. Die Entwicklung erfolgte in Normalkammern nach 30minütiger Kammersättigung über eine Laufhöhe von 15 cm.

Fließmittelgemische:

- I: Dichlormethan/Cyclohexan/Methanol/Ammoniak – 50 : 35 : 15 : 1
- II: Dioxan/Cyclohexan/Ethylacetat/Ethanol/Ammoniak – 15 : 15 : 40 : 20 : 10
- III: Toluol/Isopropanol/Ammoniak – 30 : 60 : 10

Detektionsmittel:

- A: Fluoreszenzlöschung im UV (254 nm)
  - B: konzentrierte Schwefelsäure, nach Besprühen 10 - 20 min auf der Heizplatte bei 120 °C
  - C: DRAGENDORFF-Reagenz, modifiziert [99]
  - D: MBTH-Reagenz [8]  
(Aufbewahren der Platte 10 min in einer mit Ammoniak gesättigten Kammer, nacheinander Besprühen mit 2 %iger methanolischer MBTH-Lösung und 8 %iger wässriger Kaliumhexacyanoferrat-(III)-Lösung)
- außerdem: EMERSON-Reagenz [27]

#### **5.4.1.2 Präparative Schichtchromatographie**

Für die präparative Schichtchromatographie wurden PSC-Fertigplatten, Kieselgel 60 F<sub>254</sub>, 20 x 20 cm, 2 mm Schichtdicke (Merck) und DC-Alufolien, Kieselgel 60 F<sub>254</sub>, 20 x 20 cm (Merck) verwendet. Die Entwicklung erfolgte in Normalkammern nach 30minütiger Kammersättigung über eine Laufhöhe von 16 cm. Die verwendeten Fließmittelgemische entsprachen denen der analytischen DC. Die Substanzbanden wurden detektiert, ausgekratzt oder ausgeschnitten, mit Methanol extrahiert und danach eingeeengt.

## 5.4.2 HPLC

### 5.4.2.1 Analytische HPLC

Stationäre Phase: LiChroCART<sup>®</sup> 125-4, LiChrospher<sup>®</sup> 60, RP-select B (5 µm) (Merck)  
Detektion: Dioden-Array-Detektor (bei 280 nm)  
Injektionsvolumen: 25 µl

*Methode I:* (nach SMOLINKA [4])  
Mobile Phase:  
Wässrige Ammoniumacetatlösung (0,05 M) wird mit 70 %iger Perchlorsäure auf einen pH-Wert von 2,3 eingestellt (Lösung A).  
Lösung A / Acetonitril:  
Gradient: lineare Erhöhung des Acetonitrilanteils von 20 % auf 27 % innerhalb 10 min, auf 50 % innerhalb 15 min, danach konstant 50 : 50;  
Fluss: 1,2 ml/min

*Methode II:* (nach SMOLINKA [4])  
Mobile Phase:  
Kaliumdihydrogenphosphatpuffer pH 7,5 /Acetonitril:  
Gradient: 1 min 10 % Acetonitril, danach lineare Erhöhung des Acetonitrils auf 90 % innerhalb von 17 min;  
Fluss: 1,5 ml/min

### 5.4.2.2 Präparative HPLC

Stationäre Phase: LiChroCART<sup>®</sup> 250-10, LiChrosorb RP-18 (7 µm) (Merck)  
Detektion: UV-Detektor bei 280 nm  
Injektionsvolumen: 100 µl

Die verwendeten mobilen Phasen entsprachen denen der analytischen HPLC.

### 5.4.3 UV-spektroskopische Untersuchungen

Die UV-Spektren der Metabolite wurden während der HPLC-Messungen mit Hilfe des Dioden-Array-Detektors aufgenommen. Die verwendeten Lösungsmittel entsprachen HPLC-Qualität.

### 5.4.4 IR-spektroskopische Untersuchungen

Die IR-Spektren der Verbindungen wurden in einer Konzentration von ca.  $10^{-3}$  mol/l als Kaliumbromid-Pressling oder in Chloroform als Film in Natriumchlorid-Zellen mit einer Schichtdicke von 0,266 mm aufgenommen.

### 5.4.5 Massenspektrometrische Untersuchungen

EI-Bedingungen: Ionenquelltemperatur 140 – 175 °C; Ionisationsenergie 70 eV

Die m/z-Werte sind den Massenspektren entnommen und mit den relativen Intensitäten ( $I_{\text{rel.}}$  in %) aufgeführt.

### 5.4.6 GC-MS-Untersuchungen

GC-Säule: HP 5 M.S., 30 m Länge, Innendurchmesser 0,25 mm, Filmdicke 0,25  $\mu\text{m}$

Trärgas: Helium (0,8 ml/min)

Bedingungen: Lösung der Substanz in Chloroform, Injektionsvolumen 1  $\mu\text{l}$

Temperaturverlauf: 2 min bei 120 °C, danach Anstieg von 20 °C/min bis auf 300 °C, danach isotherm

MS: Elektronenstoßionisation mit 70 eV

#### 5.4.7 Kernresonanzspektroskopische Untersuchungen

Ca. 5 - 10 mg Substanz wurden in 0,6 ml Deuterochloroform gelöst und in 5 mm Probenröhrchen bei 25 °C gegen Tetramethylsilan als internen Standard vermessen.

$^1\text{H}$ -NMR: Frequenz 300,13 MHz, 0 – 14 ppm Messbreite, 16 – 32 Akkumulationen

Spektrenberechnung: ACD/HNMR 1.0

$^{13}\text{C}$ -NMR: Frequenz 75,47 MHz, 0 – 240 ppm Messbreite, 120 - 240 Akkumulationen

Spektrenberechnung: ACD/CNMR 1.1



## 6 Zusammenfassung

Der Einsatz basischer Benzilsäureester mit einer dualistischen anticholinergen und dopaminergen Wirksamkeit als potentielle Arzneimittel bei der Therapie des Morbus Parkinson wird zur Zeit untersucht und diskutiert. Dabei spielen die Kenntnisse der Biotransformation dieser Verbindungen eine wichtige Rolle für deren Beurteilung. Ziel der vorliegenden Arbeit war zunächst die Untersuchung der Metabolisierung von ausgewählten Benzilaten in der Ratte zur Charakterisierung typischer Strukturveränderungen während der Körperpassage.

Zur Untersuchung der Biotransformation wurden vier verschiedene Benzilate ausgewählt, die sich in der aromatischen Substitution und/oder im alkoholischen Rest unterscheiden:

- (R,S)-N-Methyl-4-piperidyl 3,4-dimethoxybenzilat (**1**)
- (R,S)-N-Methyl-3-piperidyl 3,4-dimethoxybenzilat (**2**)
- N-Methyl-4-piperidyl 3,3'-dimethoxybenzilat (**3**)
- (R,S)-N-Methyl-3-piperidyl 3,3'-dimethoxybenzilat (**4**).

Die Substanzen wurden männlichen Wistarratten in einer geeigneten Konzentration mittels Schlundsonde in den Magen appliziert und deren Urin und Kot getrennt gesammelt. Für das biologische Material wurde eine Reinigungsmethode erarbeitet, bei der zunächst eine Lyophilisation mit anschließender Methanolextraktion und nachfolgend eine Flüssig-Flüssig-Extraktion über Extrelut<sup>®</sup>-Fertigsäulen erfolgte. Die Metabolite konnten in basische und saure Fraktionen getrennt werden. Durch Konjugatspaltung der Biotransformationsprodukte in den verbliebenen wässrigen Lösungen wurden die Phase-II-Metabolite erhalten. Die Isolierung der einzelnen Metabolite erfolgte durch präparative DC.

Zur Strukturaufklärung und analytischen Charakterisierung der Metabolite wurden verschiedene Methoden eingesetzt. Die wichtigste Methode zur Identifizierung stellte die Massenspektrometrie dar, die auch in Kopplung mit der Gaschromatographie Einsatz fand. NMR-spektroskopische Untersuchungen waren zumeist eingeschränkt, da die Proben nicht die benötigte Substanzkonzentration und Reinheit aufwiesen. Dennoch gelang auf diese Weise beim Hauptmetaboliten **6** der Beweis der in *p*-Stellung erfolgten aromatischen C-Oxygenierung. Die Verbindungen wurden weiterhin durch HPLC, DC und Aufnahme der UV-Spektren analytisch charakterisiert.

Die Substanzen **1**, **2**, **3** und **4** erfahren im Körper vielfältige Veränderungen. Es tritt eine Reihe von Funktionalisierungsreaktionen auf: Esterspaltung, aromatische C-Oxygenierung, O-Dealkylierung, N-Dealkylierung, Lactamisierung, N-Oxidation, Bildung von Benzophenonen, Methylierung von phenolischen Derivaten und die Reaktion zu Sulfat- und/oder Glucuronidkonjugaten. Die N-Oxidation konnte nur bei Verbindung **1** beobachtet werden. Die anderen Strukturveränderungen treten bei den vier Substanzen mit unterschiedlichen Wichtungen auf. Für die Verbindungen **1** und **2** bildet die C-Oxygenierung unter Entstehung des Phenols in *p*-Position am vorher unsubstituierten Phenylring den Hauptmetabolisierungsweg, wobei bei **2** zusätzlich die Esterspaltung dominiert. Bei den Substanzen **3** und **4** stellt die O-Dealkylierung der Methoxyfunktionen neben der Esterspaltung den dominierenden Abbauweg dar. Aromatische C-Oxygenierungen sind, vermutlich aufgrund sterischer Effekte, zurückgedrängt. 3,3'-Dimethoxybenzilate weisen im Vergleich zu den 3,4-Dimethoxybenzilaten und die N-Methyl-3-piperidylester im Vergleich den N-Methyl-4-piperidylestern eine größere Esteraseinstabilität auf und werden schneller zu Benzilsäuren und Benzophenonen abgebaut. Dies führt nach den bisherigen Erkenntnissen zu einer Wirkdauerverringerung, da nur die intakten basischen Ester als antiparkinsonaktiv angesehen werden können. Zusätzliche aromatische Substituenten, u. a. auch unter Einfluss der Biotransformation, können zu einer Wirkungsverminderung führen [3].

In geringen Mengen konnten bei allen vier Untersuchungen Phase-II-Metabolite nach Konjugatspaltung nachgewiesen werden. Es handelt sich dabei ausnahmslos um phenolische Derivate.

Über die Faeces wird ein großer Teil an Benzilsäureestern und Benzophenonen ausgeschieden. Im Gegensatz dazu erfolgt die Exkretion der Benzilsäuren ausschließlich über die Niere.

Die MS der Lactammetaboliten ließen keine eindeutige Strukturzuordnung zu. Deshalb wurden sie zu Vergleichszwecken synthetisiert. Dabei konnten die Lactame der N-Methyl-3-piperidylester durch Dehydrierung mit Hilfe von Quecksilber-II-EDTA dargestellt werden. Dieser Syntheseweg lässt sich jedoch aufgrund sterischer Aspekte nicht für die N-Methyl-4-piperidylester verwirklichen. Deren Synthese ist durch Oxidation der Ausgangsverbindungen mit Kaliumpermanganat realisierbar.

Die nachgewiesenen Biotransformationswege werden auch in anderen, in der Literatur

erwähnten Studien an Benzilaten beschrieben. Bei den vier untersuchten Verbindungen handelt es sich jedoch um die bisher im Organismus am mannigfaltigsten veränderten Benzilsäurederivate. Nach den bisherigen Ergebnissen ist es schwer, allgemeine Aussagen zur möglichen Biotransformation von Benzilsäureestern zu treffen. Generell unterliegen Benzilate im Körper Hydrolysen. Die weiteren Reaktionen hängen stark vom verwendeten *in vivo*-Modell und den jeweiligen Substitutionsmustern ab.

Mittels der biomimetischen Umsetzung der Verbindungen **1**, **2** und **3** erfolgt die Simulierung einiger wichtiger Funktionalisierungsreaktionen - Esterspaltung, Oxidation zu N-Oxiden, N-Demethylierung und Oxidation zu Benzophenonen [4]. Die Biomimetik zeigt jedoch beim Vergleich mit den Ergebnissen der Biotransformation große Defizite in der Nachahmung anderer metabolischer Reaktionen: Aromatische C-Oxygenierung, O-Dealkylierung und Lactamisierung. Besonders die Simulierung der Reaktionen an mehrfach substituierten Phenylringen scheint für der Biomimetik problematisch. Schließlich sind C-Oxygenierung bei unsubstituierter Benzilsäure und O-Dealkylierung bei einem einfach methoxylierten Benzilat beschrieben. Ungeachtet dieser Probleme dient die Biomimetik zur Darstellung sonst schwer synthetisch zugänglicher Vergleichssubstanzen.

Zukünftige Arbeiten sollten sich speziell mit enantioselektiven oder gar enantiospezifischen Aspekten der Biotransformation der Benzilate beschäftigen, worüber bisher noch nichts bekannt ist. Für einige andere Verbindungen wurde dies schon untersucht [u. a. 69, 100]. Weiterhin wäre es interessant, pharmakokinetische Parameter zu untersuchen, um Aussagen hinsichtlich der Korrelation der Wirksamkeit im Zusammenspiel mit der Biotransformation zu tätigen. Die Simulierung der Vielfalt der Stoffwechselreaktionen im Körper scheint mit den bisherigen biomimetischen Systemen besonders bei größeren, komplexeren Verbindungen noch eingeschränkt. Zur Vermeidung von Tierversuchen in der Zukunft wäre es aber nötig, diese Systeme noch zu verbessern und weiterzuentwickeln.

## Literatur

- 1 K. H. Beyer: Biotransformation der Arzneimittel; 2. Auflage, 1990, Berlin/Heidelberg/NewYork, Springer-Verlag
- 2 H.-H. Borchert: Biotransformation und Arzneimittelwirkung; PZ Prisma; 1999, **6**, S. 173-184
- 3 T. Vorwerk: Dissertation: Untersuchungen zu Synthese, Analytik, Stabilität und Pharmakologie neuer substituierter Piperidylbenzilate; Humboldt-Universität zu Berlin, 2000
- 4 K. Smolinka: Dissertation: Biomimetische Studien an Arzneistoffen mit Benzilsäure- oder Estrogenstruktur; Humboldt-Universität zu Berlin, 2001
- 5 R. Beckmann: Zum Verhalten von Benzilsäure-(N,N-dimethyl-2-hydroxymethyl-piperidinium)-ester-methylsulfat im Organismus; Arzneimittelforschung/Drug Research; 1966, **16**, S. 910-918
- 6 J. Edelson, A. Schlosser, J. F. Douglas: Benactyzine Metabolism in the Rat; Arch. int. Pharmacodyn.; 1970, **187**, S. 139-143
- 7 D. J. Jeffery, D. M. Brown, P. F. Langley: The Metabolism and Distribution of Benapryzine; Xenobiotica; 1971, **1**, S. 169-177
- 8 L. Fröhlich: Dissertation: Biomimetische Modellierung von Cytochrom-P-450-vermittelten Monooxygenierungen bei der Biotransformation von Arzneistoffen mit Diphenylmethanstruktur; Humboldt-Universität zu Berlin, 1997
- 9 T. Vorwerk, L. Fröhlich, B. Göber: Benzilate - eine Übersicht, Wirkungen, Darstellung und Eigenschaften; Pharmazie; 2001, **56**, S. 595-609
- 10 K. Dreßler: Dissertation: Analytik, Stabilität und Biotransformation (Ratte) von Propiverinhydrochlorid (Mictonorm<sup>®</sup>) und Benzilsäure[1-methylpiperidiny-(4)]ester; Humboldt-Universität zu Berlin, 1987
- 11 B. Göber, K. Dressler, P. Franke: Zur Biotransformation von Propiverinhydrochlorid (Mictonorm<sup>®</sup>) bei der Ratte; Pharmazie; 1988, **43**, S. 96-98
- 12 A. Wengler, T. Schneider, M. Zschiesche, W. Siegmund: Untersuchungen zum Metabolismus des Blasenspasmolytikum Propiverin (Mictonorm<sup>®</sup>) beim Menschen; Pharmazie; 1988, **43**, S. 652-653

- 13 G. Hüller, K.-O. Haustein, S. Scheithauer: Studies on the metabolic pattern of propiverine in urine after single administration; *Pharmazie*; 1988, **43**, S. 91-95
- 14 D. Thuemmler, W. Stoelzner: Knowledge about metabolism using the bladder spasmolytic propiverine as example - a data puzzle of *in vitro*, animal and human pharmacological studies; *Exp. Toxic. Pathol.*; 1996, **48**, S. 395
- 15 W. Siegmund, M. Nigussie, K. Tilahun, H. Aitenfissu, G. Franke, A. Wengler: Anticholinergic properties of propiverine and its metabolites; *Pharmazie*; 1990, **45**, S. 67-68
- 16 A. Wengler, W. Siegmund, K.-J. Klebingat, M. Schütz, E. Kaliwe: Metabolismus von Propiverin in adulten und fetalen Humanlebermikrosomen; *Z. Klin. Med.*; 1989, **44**, S. 221-224
- 17 Ching-Hsiu Chen, M. M. Abdel-Monem, T. P. Krick: Metabolism of N-Ethyl-3-piperidyl Benzilate in Rats; *J. Pharm. Sci.*; 1977, **66**, S. 931-935
- 18 K. Wittke: Dissertation: Untersuchungen zur Synthese, Analytik und biopharmazeutischen Charakterisierung neuer basisch substituierter Benzilsäureester; Humboldt-Universität zu Berlin, 1993
- 19 H. Lisowski: Dissertation: Analytik und Stabilität von Denaverinhydrochlorid, Bromhexin, Oxetacain und ihrer Abbauprodukte sowie Untersuchungen zur Biotransformation von Denaverinhydrochlorid; Humboldt-Universität zu Berlin, 1988
- 20 A. Staab: Pharmacokinetic and Bioavailability Investigations of the Neurotropic-Musculotropic Spasmolytic Agent Denaverine; Aachen - Maastricht, Shaker Verlag GmbH, 1998
- 21 E. H. Strack: Dissertation: Metabolismus von Denaverin; Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main, 1999
- 22 J. v. Cantfort, J. de Graeve, C. Puozzo: Differences in the metabolism of epicainide in rats and man; *Xenobiotica*; 1989, **19**, S. 11-23
- 23 G. Schladitz-Keil, H. Spahn, E. Mutschler: Determination of the Bioavailability of the Quaternary Compound Trospium Chloride in Man from Urinary Excretion Data; *Arzneimittelforschung/Drug Res.*; 1986, **36**, S. 984-987
- 24 S. Beckmann-Knopp, S. Rietbrock, R. Weyhenmeyer, R. H. Böcker, K. T. Beckurts, W. Lang, U. Fuhr: Inhibitory Effects of Trospium Chloride on Cytochrome P450 Enzymes in Human Liver Microsomes; *Pharmacology &*

- Toxicology; 1999, **85**, S. 299-304
- 25 G. Schladitz-Keil, H. Spahn, E. Mutschler: Fluorimetric Determination of the Quaternary Compound Trospium and its Metabolite in Biological Material after Derivatization with Benoxaprofen Chloride; J. Chrom.; 1985, **345**, S. 99-110
- 26 T. Müller-Bohn: Pillen statt Windeln: für mehr Lebensqualität; DAZ; 2000, **140**, S. 3574-3576
- 27 H. Jork, W. Funk, W. Fischer, H. Wimmer: Dünnschichtchromatographie: Reagenzien und Nachweismethoden; Band 1a, 1. korrigierter Nachdruck der 1. Auflage Weinheim, VCH VerlagsgesellschaftmbH, 1990
- 28 H. J. Roth, K. Eger, R. Troschütz: Pharmazeutische Chemie II, Arzneistoffanalyse; 3. Auflage, Stuttgart, New York, Georg Thieme Verlag, 1990
- 29 B. A. Petersen, P. Vouros, J. M. Parker, B. L. Karger: Mass Spectrometry as an Aid in the Detection and Identification of Piperidyl Benzilates and Related Glycolates; J. Forensic. Sci; 1976, **21**, S. 279
- 30 H. Budzikiewicz, C. Djerassi, D. H. Williams: Mass spectrometry of Organic Compounds; San Francisco, Cambridge, London, Amsterdam, Holden-Day, INC, 1967
- 31 A. M. Duffield, H. Budzikiewicz, D. H. Williams, C. Djerassi: Mass Spectrometry in Structural and Stereochemical Problems. LXIV. A Study of the Fragmentation Processes of Some Cyclic Amines; J. Am. Chem. Soc.; 1965, **87**, S. 810-816
- 32 A. Vincze, L. Gefen, A. Fisher, P. Bel: Low Resolution Electron Impact Mass Spectra of Some Quinuclidine and *N*-Methylpiperidine Glycolates; J. Forensic. Sci.; 1980, **25**, S. 655-665
- 33 T. A. Bryce, J. R. Maxwell: Identification of the N-Oxide Group by Mass Spektrometry; Chem. Commun.; 1965, **11**, S. 206-207
- 34 G. Rücker, M. Neugebauer, G. G. Willems: Instrumentelle pharmazeutische Analytik; 3. Auflage, Stuttgart, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart, 2001
- 35 S. Scheithauer: Synthese einiger Metabolite des Blasenspasmodikums Propiverinhydrochlorid (Mictonorm); Pharmazie; 1988, **43**, S. 86-90
- 36 G. Hüller, K.-O. Haustein, S. Scheithauer: Studies on the metabolic pattern of

- propiverine in urine after single administration; Pharmazie; 1988, **43**, S. 91-95
- 37 Ulrike Birnbaum: Diplomarbeit: Untersuchungen zur Stabilität von N-Methyl-3-piperidyl 3,4-dimethoxybenzilat-HCl, N-Methyl-4-piperidyl 3,3'-dimethoxybenzilat-HCl und N-Methyl-3-piperidyl 3,3'-dimethoxybenzilat-HCl; Humboldt-Universität zu Berlin, 2000
- 38 H. Möhrle: Darstellung von Hydroxylaktamen durch Quecksilber-(II)-ÄDTA-Dehydrierung, 1. Mitt.: Modellversuche zur Cevindehydrierung; Arch. Pharm.; 1964, **297** (8), S. 474-487
- 39 H. Möhrle: Darstellung von Hydroxylactamen durch Quecksilber-(II)-ÄDTA-Dehydrierung, 2. Mitt.: Einfluss der Salzbildung auf die Dehydrierungsrate in vergleichenden Untersuchungen mit und ohne Komplexbildner; Arch. Pharm.; 1965, **298** (2), S. 101-107
- 40 H. Möhrle: Darstellung von Hydroxylactamen durch Quecksilber-(II)-ÄDTA-Dehydrierung; Arch. Pharm.; 1965, **298** (6), S. 379-384
- 41 H. Möhrle: Darstellung von Hydroxylactamen durch Quecksilber-(II)-ÄDTA-Dehydrierung, 6. Mitt.: Umsetzung von 1-Phenyl-2-(3'-methylpiperidino)-äthanol-(1); Arch. Pharm.; 1965, **298** (7), S. 440-447
- 42 H. Möhrle, M. Jeandré, E. Breitmaier, J. Rohonczy: Darstellung und Atropisomerie von 1-(2-Aryl)-piperidin-2-onen; J. Prakt. Chem.; 2000, **342** (5), S. 473-485
- 43 H. Möhrle: Darstellung von Hydroxylactamen durch Quecksilber-(II)-ÄDTA-Dehydrierung, 13. Mitt.: Entalkylierung und intramolekulare Reaktion von Aminoalkoholen; Arch. Pharm.; 1966, **299** (2), S. 113-121
- 44 H. Kessler, H. Möhrle: Zur Struktur einiger Hydroxy-piperidon-(2)-Derivate; Z. Naturforschg.; 1969, **24 b**, S. 301-306
- 45 H. Möhrle, H. Weber: Isomere 3-hydroxylierte 2- und 6-Piperidone; Tetrahedron; 1971, **27**, S. 3241-3246
- 46 H. Möhrle: Darstellung von Hydroxylactamen durch Quecksilber-(II)-ÄDTA-Dehydrierung, 14. Mitt.: Mechanismus der Dehydrierung mit Quecksilber-(II)-ÄDTA; Arch. Pharm.; 1966, **299** (2), S. 122-131
- 47 H. Möhrle, P. Gundlach: Raumerfüllung und Acidität bei Amindehydrierungen; Arch. Pharm.; 1969, **302** (4), S. 291-296
- 48 J. Bosch, D. Mauleón, M. Feliz, R. Granados: Mercuric Acetate Cyclization of

- 4-(Pyrrolylmethyl)- and 4-(Indolylmethyl)piperidines to Bridged Polycyclic Systems; J. Org. Chem.; 1983, **48**, S. 4836-4841
- 49 H. Möhrle, M. Class: Vergleich von Dehydrierungen mit Quecksilber-(II)-acetat und Dinatriumquecksilber-(II)-EDTA; Pharmazie; 1986, **41**, S. 384-388
- 50 E. Wenkert, E. C. Angell: Preparation of Lactams via Oxidation of Cyclic Tertiary and Secondary Amines with Hg(II)-EDTA Complex in Alkaline Medium; Synthetic Communications; 1988, **18** (12), S. 1331-1337
- 51 R. M. Moriarty, R. K. Vaid, M. P. Duncan, M. Ochiai, M. Inenaga, Y. Nagao: Hypervalent Iodine Oxidation of Amines using Iodosobenzene: Synthesis of Nitriles, Ketones and Lactames; Tetrahedron Letters; 1988, **29** (52), S. 6913-6916
- 52 O. E. Edwards, F. H. Clarke, B. Douglas: 17-Hydroxylupanine and 17-Oxylupanine; Canad. J. Chem.; 1954, **32**, S. 235-241
- 53 M. Rink, K. Grabowski: Zur Kenntnis des 17-Hydroxylsparteins; Arch. Pharm.; 1956, **289/61** (12), S. 695-702
- 54 G. Lin, K. K. Midha, E. M. Hawes: Synthesis of the Piperidinone Metabolites of Piperidine Type Phenothiazine Antipsychotic Drugs via Ruthenium Tetroxide Oxidation; J. Heterocycl. Chem.; 1991, **28**, S. 215-219
- 55 G. Rücker, M. Neugebauer, D. Zhong: Synthese einiger Metaboliten und der Enantiomeren des Prolintans; Arch. Pharm.; 1992, **325**, S. 47-52
- 56 A. M. Duffield, H. Budzikiewicz, C. Djerassi: Mass Spectrometry in Structural and Stereochemical Problems. LVIII. A Study of the Fragmentation Processes of Some Lactams; J. Am. Chem. Soc.; 1964, **86**, S. 5536-5541
- 57 H. Budzikiewicz, C. Djerassi, D. H. Williams: Mass Spectrometry of Organic Compounds; San Francisco, Cambridge, London, Amsterdam, Holden-Day, Inc., 1967
- 58 J. Selent: Persönliche Mitteilung vom 24.09.2001
- 59 F. P. Guengerich: Oxidative Cleavage of Carboxylic Esters by Cytochrome P-450; J. Biol. Chem.; 1987, **262**, S. 8459-8462
- 60 J. G. Slatter, F. S. Abbott, R. Burton: Identification of the biliary metabolites of 3-dimethylamino-1,1-diphenylbutane HCl (recipavrin) in rats; Xenobiotica; 1990, **20**, S. 999-1024
- 61 W.-N. Wu, J. F. Hills, S. Y. Chang: *In vivo* biotransformation of fenoctimine in



- rat, dog and man; *Xenobiotica*; 1994, **24**, S. 1133-1148
- 62 J. W. Gorrod, D. J. Temple: The Formation of an N-Hydroxymethyl Intermediate in the N-Demethylation of N-Methylcarbazole *in vivo* and *in vitro*; *Xenobiotica*; 1976, **6**, S. 265-274
- 63 F. P. Guengerich, O. Okazaki, Y. Seto, T. L. MacDonald: Radical cation intermediates in N-dealkylation reactions; *Xenobiotica*; 1995, **25**, S. 689-709
- 64 S. B. Karki, J. P. Dinnocenzo: On the mechanism of amine oxidations by P450; *Xenobiotica*; 1995, **25**, S. 711
- 65 J. I. Manchester, J. P. Dinnocenzo, L. Higgins, J. P. Jones: A New Mechanistic Probe for Cytochrome P450: An Application of Isotope Effect Profiles; *J. Am. Chem. Soc.*; 1997, **119**, S. 5069-5070
- 66 L. R. Hall, R. T. Iwamoto, R. P. Hanzlik: Electrochemical Models for Cytochrome P-450. N-Demethylation of Tertiary Amides by Anodic Oxidation; *J. Org. Chem.*; 1989, **54**, S. 2446-2451
- 67 L. R. Hall, R. P. Hanzlik: Kinetic Deuterium Isotope Effects on the N-Demethylation of Tertiary Amides by Cytochrome P-450; *J. Biol. Chem.*; 1990, **265**, S. 12349-12355
- 68 Y. Urano, T. Higuchi, M. Hirobe: Substrate-dependent changes of the oxidative O-dealkylation mechanism of several chemical and biological oxidizing systems; *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*; 1996, S. 1169-1173
- 69 J. Rose, N. Castagnoli jr.: The Metabolism of Tertiary Amines; *Med. Res. Rev.*; 1983, **3**, S. 73-88
- 70 B. Testa, P. Jenner: Drug Metabolism - Chemical and Biochemical Aspects; New York and Basel, Marcel Dekker, 1976
- 71 H. Oelschläger, W. Schmidt: Die N-Oxidation - ein Zwischenschritt bei der Biosynthese von Lactamen aus tertiären Cycloalkylaminen; *Arch. Pharm.*; 1992, **325**, S. 41-45
- 72 H. Oelschläger, W. Schmidt: Weitere Beiträge zur intramolekularen Umlagerung von N-Oxiden tertiärer Cycloalkylamine zu Lactamen (Frankfurt Shift); *Arch. Pharm.*; 1994, **327**, S. 163-167
- 73 G. D. Byrd, K.-M. Chang, J. M. Greene, J. D. deBethizy: Evidence for urinary excretion of glucuronide conjugates of nicotine and trans-3'-hydroxycotinine in smokers; *Drug Metab. Dispos.*; 1992, **20**, S. 192-197

- 74 H. Masumoto, S. Ohta, M. Hirobe: Application of chemical cytochrome P-450 model systems to studies on drug metabolism. IV. Mechanism of piperidine metabolism pathways via an iminium intermediate; *Drug Metab. Dispos.*; 1991, **19**, S. 768
- 75 G. Lin, E. M. Hawes, G. McKay, K. K. Midha: The metabolism of piperidine-type phenothiazine antipsychotic agents. I. Sulfuridazine in the rat; *Xenobiotica*; 1992, **22**, S. 303-317
- 76 G. Lin, E. M. Hawes, G. McKay, S. F. Cooper, E. D. Korchinski, K. K. Midha: The metabolism of piperidine-type phenothiazine antipsychotic agents, II. Sulfuridazine in dog and human; *Xenobiotica*; 1993, **23**, S. 27-36
- 77 G. Lin, E. M. Hawes, G. McKay, E. D. Korchinski, K. K. Midha: The metabolism of piperidine-type phenothiazine antipsychotic agents. III. Mesoridazine in dog, human and rat; *Xenobiotica*; 1993, **23**, S. 37-52
- 78 G. Lin, E. M. Hawes, G. McKay, E. D. Korchinski, K. K. Midha: Metabolism of piperidine-type phenothiazine antipsychotic agents. IV. Thioridazine in dog, man and rat; *Xenobiotica*; 1993, **23**, S. 1059-1074
- 79 S. Yoshihara, H. Yoshimura: Metabolism of Prolintane in Rats and the Effect of Prolintane Metabolites on General Activities in Mice; *Xenobiotica*; 1974, **4**, S. 529-535
- 80 G. Guroff, J. W. Daly, D. M. Jerina, J. Renson, B. Witkop, S. Udenfriend: Hydroxylation-Induced Migration: The NIH Shift; *Science*; 1967, **157**, S. 1524-1530
- 81 D. M. Jerina, J. W. Daly: Arene Oxides: A New Aspect of Drug Metabolism; *Science*; 1974, **185**, S. 573-582
- 82 D. M. Jerina, J. W. Daly, B. Witkop, P. Zaltzman-Nirenberg, S. Udenfried: The Role of Arene Oxide-Oxepin Systems in the Metabolism of Aromatic Substrates. III. Formation of 1,2-Naphthalen Oxide from Naphthalene by Liver Microsomes; *J. Amer. Chem. Soc.*; 1968, **90**, S. 6525-6527
- 83 M. A. A. Moustafa, M. Claesen, J. Adline, D. Vandervorst, J. H. Poupaert: Evidence for an Arene-3,4-oxide as a Metabolic Intermediate in the meta- and para-Hydroxylation of Phenytoin in the Dog; *Drug Metab. Dispos.*; 1983, **11**, S. 574-580
- 84 M. Claesen, M. A. A. Moustafa, J. Adline, D. Vandervorst, J. H. Poupaert:

- Evidence for an Arene Oxide-NIH Shift Pathway in the Metabolic Conversion of Phenytoin to 5-(4-Hydroxyphenyl)-5-Phenylhydantoin in the Rat and in Man; *Drug Metab. Dispos.*; 1982, **10**, S. 667-671
- 85 M. L. E. Bergh, J. de Vries: High-Pressure Liquid Chromatographic Separation of Diphenhydramin and some of its Metabolites: Effects of Eluent Salt Concentration on Chromatographic Characteristics; *J. Liquid Chrom.*; 1980, **3** (8), S. 1173-1181
- 86 S. Goenechea, G. Eckhardt, W. Fahr: Isolierung einiger Metaboliten von Bromazin aus menschlichem Harn und ihre Identifizierung; *Arzneimittelforschung/Drug Res.*; 1980, **30 (II)**, S. 1580-1584
- 87 J. Axelrod: I. Methylation Reactions in the Formation and Metabolism of Catecholamines and other Biogenic Amines; *Pharmacological Reviews*; 1966, **18**, S. 95-113
- 88 C. R. Creveling, N. Morris, H. Shimuzu, H. H. Ong, J. Daly: Catechol O-Methyltransferase IV. Factors Affecting *m*- and *p*-Methylation of Substituted Catechols; *Mol. Pharmacol.*; 1972, **8**, S. 398-409
- 89 H.-H. Borchert: Biotransformation und Arzneimittelwirkung; *PZ Prisma*; 1999, **6** (4), S. 255-264
- 90 S. Pfeifer, P. Pflegel, H.-H. Borchert: *Biopharmazie*; Berlin, Wiesbaden, Ullstein Mosby GmbH, 1995
- 91 G. J. Mulder: Glucuronidation and its Role in Regulation of Biological Activity of Drugs; *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*; 1992, **32**, S. 25-47
- 92 B. Norén, S. Strömberg, Ö. Ericsson, B. Vangbo, M. Grälls, L. Widlund, B. Lindeke: Biotransformation of terodiline; *Acta Pharm Suec*; 1985, **22**, S. 131-146
- 93 H. Kinoshita, Y. Tohira, H. Sugiyama, M. Sawada: Studies on the metabolism of Inabenfide (a new plant growth regulator) in rats I. Characterization of metabolites in rats; *Xenobiotica*; 1987, **17**, S. 925-939
- 94 B. Göber, M. A. Al Mardini, P. Franke: Clemastinmetaboliten aus Kot und Harn der Ratte; *Pharmazie*; 1989, **44**, S. 847-851
- 95 S. Goenechea, G. Rücker, H. Brzezinka, G. Hoffmann, M. Neugebauer, G. Glanzmann: Untersuchungen zur Biotransformation von Meclozin im menschlichen Körper; *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*; 1988, **26**, S. 105-115

- 96 H. K. Jajoo, R. F. Mayol, J. A. LaBudde, I. A. Blair: Structural Characterization of Urinary Metabolites of the Antiarrhythmic Drug Encainide in Human Subjects; *Drug Metab. Dispos.*; 1990, **18**, S. 28-35
- 97 J. Weymann, V. Bühler, H. G. Hege, H. Müller-Peltzer, G. Schenk, B. Stieren, M. Hollmann: Metabolism of the Calcium Antagonist Gallopamil in Man; *Arzneimittelforschung/Drug Res.*; 1989, **39 (I)**, Nr. 5, S. 605-607
- 98 I. A. Kaye, H. C. Klein, W. J. Burlant: Iodine-catalyzed Benzoylations; *J. Am. Chem. Soc.*; 1953, **75**, S. 745
- 99 H. Auterhoff, K.-A. Kovar: Identifizierung von Arzneistoffen; 6. Auflage Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, 1998
- 100 C.-H. Yun, R. A. Okerholm, F. P. Guengerich: Oxidation of the Antihistaminic Drug Terfenadine in Human Liver Microsomes; *Drug Metab. Dispos.*; 1993, **21**, S. 403-409

## Verzeichnis der verwendeten Substanzbezeichnungen (Teil II)

<u>35</u>	(R,S)-Methyl 3,4-dimethoxybenzilat
<u>36</u>	(R,S)-Methyl 4-hydroxy-3-methoxybenzilat
<u>37</u>	(R,S)-Methyl 4'-hydroxy-3,4-dimethoxybenzilat
<u>38</u>	(R,S)-N-Methyl-4-piperidyl 3-hydroxy-3'-methoxybenzilat
<u>39</u>	(R,S)-N-Methyl-4-piperidyl 4-hydroxy-3,3'-dimethoxybenzilat
<u>40</u>	(R,S)-N-Methyl-4-piperidyl 3',4-dihydroxy-3-methoxybenzilat
<u>41</u>	N-Methyl-4-piperidyl 3,3'-dihydroxybenzilat
<u>42</u>	4-Piperidyl 3,3'-dimethoxybenzilat
<u>43</u>	(R,S)-4-Piperidyl 3-hydroxy-3'-methoxybenzilat
<u>44</u>	(R,S)-4-Piperidyl 4-hydroxy-3,3'-dimethoxybenzilat
<u>45</u>	(R,S)-N-Methyl-2-oxo-4-piperidyl 3,3'-dimethoxybenzilat
<u>46</u>	3,3'-Dimethoxybenzilsäure
<u>47</u>	(R,S)-3-Hydroxy-3'-methoxybenzilsäure
<u>48</u>	(R,S)-4-Hydroxy-3,3'-dimethoxybenzilsäure
<u>49</u>	(R,S)-3',4-Dihydroxy-3-methoxybenzilsäure
<u>50</u>	3,3'-Dihydroxybenzilsäure
<u>51</u>	3,3'-Dimethoxybenzophenon
<u>52</u>	3-Hydroxy-3'-methoxybenzophenon
<u>53</u>	4-Hydroxy-3,3'-dimethoxybenzophenon
<u>54</u>	3',4-Dihydroxy-3-methoxybenzophenon
<u>55</u>	3,3'-Dihydroxybenzophenon
<u>56</u>	(R,S)-N-Methyl-3-piperidyl 3-hydroxy-3'-methoxybenzilat
<u>57</u>	(R,S)-N-Methyl-3-piperidyl 4-hydroxy-3,3'-dimethoxybenzilat
<u>58</u>	(R,S)-N-Methyl-3-piperidyl 3',4-dihydroxy-3-methoxybenzilat
<u>59</u>	(R,S)-N-Methyl-3-piperidyl 3,3'-dihydroxybenzilat
<u>60</u>	(R,S)-3-Piperidyl 3,3'-dimethoxybenzilat
<u>61</u>	(R,S)-3-Piperidyl 3-hydroxy-3'-methoxybenzilat
<u>62</u>	(R,S)-3-Piperidyl 4-hydroxy-3,3'-dimethoxybenzilat
<u>63</u>	(R,S)-3-Piperidyl 3',4-dihydroxy-3-methoxybenzilat
<u>64</u>	(R,S)-3-Piperidyl 3,3'-dihydroxybenzilat
<u>65</u>	(R,S)-N-Methyl-3-piperidyl 4,4'-dihydroxy-3,3'-dimethoxybenzilat
<u>66</u>	(R,S)-3-Piperidyl 4,4'-dihydroxy-3,3'-dimethoxybenzilat
<u>67</u>	(R,S)-N-Methyl-6-oxo-3-piperidyl 3-hydroxy-3'-methoxybenzilat
<u>68</u>	Methyl 3,3'-dimethoxybenzilat
<u>69</u>	(R,S)-Methyl 3-hydroxy-3'-methoxybenzilat

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe.

Berlin, im Dezember 2001